

MANNELIJKE INFERTILITEIT EN
IN-VITRO-FERTILISATIE

(The Director of Hatcheries and Conditioning) passed on to a consideration of optimum temperature, salinity, viscosity; referred to the liquor in which the detached and ripened eggs were kept; and, leading his charges to the work tables, actually showed them how this liquor was drawn off from the test-tubes; how it was let out drop by drop on to the specially warmed slides of the microscopes; how the eggs which it contained were inspected for abnormalities, counted and transferred to a porous receptacle; how (and he took them to watch the operation) this receptacle was immersed in a warm bouillon containing free-swimming spermatozoa -at a minimum concentration of one hundred thousand per cubic centimetre, he insisted; and how, after ten minutes, the container was lifted out of the liquor and its contents re-examined; how if any of the eggs remained unfertilized, it was again immersed, and if necessary, yet again; how the fertilized ova went back to the incubators.

Uit *'Brave New World'* door Aldous Huxley, 1932

MANNELIJKE INFERTILITEIT EN IN-VITRO-FERTILISATIE

Male infertility and in vitro fertilization

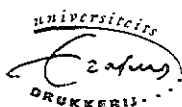
PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS PROF. DR. C.J. RIJNVOS
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 28 APRIL 1993 OM 15.45 UUR

DOOR

JOSEPHUS JOHANNES CLEMENS MARIA VAN DE LEUR

GEBOREN TE MADE EN DRIMMELEN



PROMOTIECOMMISSIE

Promotor: Prof. dr. G.H. Zeilmaker

Overige leden: Prof. dr. A.C. Drogendijk
Prof. dr. S.W.J. Lamberts
Prof. dr. A.C. Van Steirteghem (Vrije Universiteit Brussel)

Ter herinnering aan mijn moeder

INHOUD

| | | |
|---------|---|----|
| | Inleiding | 11 |
| 1 | IVF als behandeling van mannelijke infertiliteit | 13 |
| 2 | Referenties | 14 |
| 1 | Gameten en de bevruchting | 15 |
| 1.1 | Oerkiemcellen | 15 |
| 1.2 | Oögenese en ovulatie | 17 |
| 1.2.1 | Aanzet tot de meiotische deling | 17 |
| 1.2.2 | Vorming van de Graafse follikel | 18 |
| 1.2.3 | Het aantal groeiende follikels | 18 |
| 1.2.4 | Vervolg van de eerste meiotische deling en de ovulatie | 19 |
| 1.2.5 | Celorganellen van de oöcyt | 21 |
| 1.3 | Spermatogenese en zaadcelfuncties | 22 |
| 1.3.1 | Mitotische en meiotische delingen | 22 |
| 1.3.2 | Spermiogenese | 23 |
| 1.3.3 | Opbouw van de rijpe zaadcel | 23 |
| 1.3.4 | De zaadcelcyclus | 24 |
| 1.3.5 | Hormonale beïnvloeding van de spermatogenese | 24 |
| 1.3.6 | De epididymis | 24 |
| 1.3.7 | Zaadcelaantallen en passage van de vrouwelijke tractus genitalis | 26 |
| 1.3.8 | Capacitatie | 32 |
| 1.3.9 | Het acrosoom en de acrosoomreactie | 34 |
| 1.3.10 | Inductie van de acrosoomreactie | 35 |
| 1.3.11 | Modellen voor de acrosoomreactie | 36 |
| 1.4 | De bevruchting | 36 |
| 1.4.1 | Passage van de cumulus oöphorus | 36 |
| 1.4.2 | De zona pellucida | 37 |
| 1.4.2.1 | Binding aan de zona pellucida | 37 |
| 1.4.2.2 | Penetratie van de zona | 38 |
| 1.4.3 | Oölemma | 39 |
| 1.4.4 | Eicelactivatie | 40 |
| 1.4.5 | Zonareactie | 40 |
| 1.4.6 | Zaadceldecondensatie | 42 |
| 1.4.7 | Voltooiing van de tweede meiotische deling | 42 |
| 1.5 | Referenties | 43 |
| 2 | Historie van de kweek van eicellen en embryo's in vitro | 53 |
| 2.1 | Referenties | 55 |
| 3 | De relatie tussen semenparameters, bevruchting en zwangerschap bij in-vitro-fertilisatie. Retrospectief onderzoek naar de resultaten van het IVF-laboratorium Dijkzigt/AZR | 57 |
| 3.1 | Inleiding | 57 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.2 | Behandelingsresultaten per punctie | 58 |
| 3.2.1 | Materiaal en methode | 58 |
| 3.2.2 | Resultaten van IVF-behandelingen uitgedrukt per punctie | 60 |
| 3.2.2 | Discussie | 64 |
| 3.3 | Behandelingsresultaten per patiënt | 67 |
| 3.3.1 | Inleiding | 67 |
| 3.3.2 | Materiaal en methode | 67 |
| 3.3.3 | Resultaten van IVF-behandelingen uitgedrukt per patiënt | 68 |
| 3.3.4 | Discussie | 70 |
| 3.4 | Referenties | 70 |
| 4 | Het gebruik van Percoll voor het opwerken van zaadcellen bij andrologische en onbegrepen infertiliteit | 73 |
| 4.1 | Inleiding | 73 |
| 4.2 | Materiaal en methoden | 73 |
| 4.2.1 | Patiënten | 73 |
| 4.2.2 | Centrifugering/opzwemmethode | 74 |
| 4.2.3 | Percoll-methode | 75 |
| 4.2.4 | Inseminatie | 75 |
| 4.2.5 | Pronucleusinspectie en transplantatie | 76 |
| 4.3 | Resultaten | 76 |
| 4.4 | Discussie | 79 |
| 4.5 | Referenties | 82 |
| 5 | Ontwikkeling van de micromanipulatie | 84 |
| 5.1 | Inleiding | 84 |
| 5.2 | De intracytoplasmatische zaadcelinjectie | 87 |
| 5.3 | Zona-incisie, zonacracking en zonaperforatie | 87 |
| 5.4 | Subzonale micro-injectie of micromanipulatie | 92 |
| 5.5 | Referenties | 92 |
| 6 | Subzonale inseminatie: literatuuroverzicht | 96 |
| 6.1 | Referenties | 100 |
| 7 | Subzonale inseminatie bij de muis | 102 |
| 7.1 | Inleiding | 102 |
| 7.2 | Beschrijving van de micro-injectie techniek | 103 |
| 7.2.1 | Verkrijgen van gameten | 103 |
| 7.2.2 | Vervaardiging en gebruik van de pipetten | 104 |
| 7.2.3 | Uitvoering van de micro-inseminatie | 105 |
| 7.2.4 | Controle experimenten | 106 |
| 7.3 | Experiment 1: Micro-inseminatie met verschillende aantallen zaadcellen | 107 |
| 7.3.1 | Inleiding | 107 |
| 7.3.2 | Resultaten | 108 |
| 7.4 | Experiment 2: Ontwikkeling van muize-embryo's ontstaan na micro-inseminatie | 108 |
| 7.4.1 | Inleiding | 108 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 7.4.2 | Resultaten | 109 |
| 7.5 | Experiment 3: Transplantatie van micro-inseminatie embryo's | 110 |
| 7.5.1 | Inleiding | 110 |
| 7.5.2 | Methoden | 110 |
| 7.5.3 | Resultaten | 111 |
| 7.6 | Experiment 4: Pronucleusinspectie van muize-oöcyten na micro-inseminatie | 111 |
| 7.6.1 | Inleiding | 111 |
| 7.6.2 | Methoden | 112 |
| 7.6.3 | Resultaten | 112 |
| 7.7 | Discussie | 113 |
| 7.8 | Referenties | 118 |
| 8. | Micro-inseminatie bij de mens, een controle studie: in-vitro-inseminatie versus micro-inseminatie | 121 |
| 8.1 | Inleiding | 121 |
| 8.2 | Protocol ingediend bij de MEC en de KEMO | 122 |
| 8.2.1 | Inleiding | 122 |
| 8.2.2 | Technische uitvoering van de micro-inseminatie | 123 |
| 8.2.3 | Risico-analyse | 123 |
| 8.2.4 | Behandeling | 126 |
| 8.2.5 | Informed consent | 127 |
| 8.3 | Patiëntenselectie | 129 |
| 8.4 | Uitvoering | 130 |
| 8.5 | Resultaten | 132 |
| 8.6 | Discussie | 135 |
| 8.7 | Referenties | 138 |
| | Samenvatting | 142 |
| | Summary | 144 |
| | Lijst van gebruikte afkortingen | 146 |
| | Dankwoord | 147 |
| | Curriculum vitae | 148 |

INLEIDING

Infertiliteit is een belangrijk probleem bij veel paren met kinderwens. Algemeen wordt aangenomen dat bij 10% van alle paren met kinderwens sprake is van infertiliteit (Mosker,1982; Vaessen,1984).

Er zijn vele definities van infertiliteit. Een van de meest gebruikte definities zegt dat er van infertiliteit sprake is als er tenminste 12 maanden onbeschermd coïtus heeft plaatsgevonden zonder dat er een zwangerschap is opgetreden (Comhaire,1987). De oorzaak van de infertiliteit kan bij de vrouw liggen, bij de man of bij beiden. In een grote studie naar de oorzaken van infertiliteit verricht door de WHO, werden 7273 infertiele paren onderzocht verdeeld over 33 centra in de wereld (Comhaire,1987). Van de 4728 paren waarbij onderzoek bij man en vrouw had plaatsgevonden waren er 1253 (26,5%) waar bij beide partners een afwijking werd gevonden. In tabel 1.1 zijn de gegevens van deze studie weergegeven.

Tabel 1: Oorzaken van infertiliteit bij 4728 paren met één jaar onvervulde kinderwens (Comhaire,1987).

| Infertiliteitsoorzaak | | # patiënten |
|-----------------------|-------------------|--------------|
| fertiliteit man | fertiliteit vrouw | |
| afwijkend | geen afwijkingen | 942 (19,9%) |
| afwijkend | afwijkend | 1253 (26,5%) |
| geen afwijkingen | geen afwijkingen | 709 (14,9%) |
| geen afwijkingen | afwijkend | 1824 (38,6%) |

Bij minstens de helft van de patiënten is er dus een (bijkomende) mannelijke oorzaak van de onvruchtbaarheid.

Het begrip mannelijke infertiliteit kent verschillende definities, die ook nog regelmatig veranderen. De meest bekende definitie is die van de WHO, waarbij uitgegaan wordt van de duur van infertiliteit en van het semenmonster. Volgens de WHO is sprake van mannelijke infertiliteit als een van de volgende parameters afwijkend is:

- minimaal volume van het ejaculaat van 1,5 ml
- concentratie zaadcellen in ejaculaat minstens 20 miljoen/ml
- minstens 40% van de zaadcellen bezit een progressieve motiliteit
- minstens 50% van de zaadcellen bezit een normale morfologie

Infertiliteit blijkt geen alles of niets fenomeen te zijn, het kent een spectrum van subfertiliteit tot fertiliteit. De kans op zwangerschap is afhankelijk van de oorzaak van de infertiliteit en zal behalve bij uitzonderingen als b.v. een azoöspermie of beiderzijds afgesloten eileiders, zelden 0 zijn.

Er bestaan veel verschillende afwijkingen die gevonden kunnen worden bij het onderzoek naar mannelijke infertiliteit. In de reeds genoemde WHO-studie is een analyse gemaakt van de verschillende gevonden afwijkingen, zie tabel 2.

INLEIDING

Tabel 2: Aantal gevonden afwijkingen bij mannelijke infertiliteit (Comhaire, 1987)

| Diagnose | # patiënten | % van totaal aantal |
|---------------------------------|-------------|---------------------|
| varicokèle | 806 | 22,7% |
| idiopathische oligozoöspermie | 717 | 20,2% |
| prostatitis/epididymitis | 441 | 12,4% |
| idiopathische teratozoöspermie | 376 | 10,6% |
| idiopathische asthenozoöspermie | 252 | 7,1% |
| seminaalplasma afwijking | 224 | 6,3% |
| immunologische factor | 193 | 5,4% |
| congenitale afwijking | 106 | 3,0% |
| systeemziekten | 91 | 2,6% |
| sexuele dysfunctie | 81 | 2,3% |
| obstructieve azospermie | 58 | 1,6% |
| idiopathische necrozoöspermie | 49 | 1,4% |
| ejaculatiestoornis | 42 | 1,2% |
| hyperprolactinemie | 39 | 1,1% |
| iatrogene oorzaak | 36 | 1,0% |
| genetische afwijking | 31 | 0,9% |
| partiële obstructie | 6 | 0,2% |
| retrograde ejaculatie | 4 | 0,1% |
| immotiel cilia syndroom | 1 | 0,0% |
| hypofysaire laesie | 1 | 0,0% |
| gonadotrofine deficiëntie | 1 | 0,0% |

Zoals in tabel 2 te zien is, is er in vele gevallen geen oorzaak voor de gevonden afwijking te vinden: idiopathisch.

De voorgeschiedenis van een patiënt kan de oorzaak van de mannelijke infertiliteit verklaren. In tabel 3 zijn verschillende ziektebeelden die mannelijke infertiliteit kunnen veroorzaken en hun odds-ratio (een benadering voor de verhouding van de incidenties van infertiliteit in de groep patiënten met een ziektebeeld uit tabel 1.3 t.o.v. patiënten zonder dit ziektebeeld) weergegeven.

INLEIDING

Tabel 3: Ziektebeelden die mogelijk tot mannelijke infertiliteit kunnen leiden en hun odds-ratio (Comhaire, 1987).

| Ziektebeeld | # patiënten | odds-ratio (95% betrouwbaarheidsinterval) |
|---|-------------|---|
| sexueel overdraagbare aandoening | 512 | 1,21 (1,01-1,45) |
| parotitis (na de puberteit) | 229 | 1,86 (1,42-2,44) |
| parotitis orchitis (bilateraal) | 32 | 6,28 (2,41-16,32) |
| diabetes mellitus | 20 | 1,72 (0,70-4,22) |
| bronchiëctasis | 17 | 5,37 (1,54-18,72) |
| parasitaire infectie | 201 | 1,03 (0,78-1,06) |
| hoge koorts (in de laatste zes maanden) | 73 | 2,09 (1,29-3,39) |
| neurologische aandoening | 43 | 1,20 (0,66-2,19) |
| urinewegsinfectie | 504 | 1,82 (1,51-2,19) |
| testis maldescensus links | 504 | 1,98 (0,99-3,93) |
| testis maldescensus rechts | 56 | 2,47 (1,40-4,33) |
| testis maldescensus bilateraal | 29 | 3,67 (1,57-8,60) |
| testistrauma | 195 | 1,54 (1,15-2,05) |
| testistorsie | 195 | 1,54 (1,15-73,65) |
| epididymo-orchitis | 124 | 2,75 (1,86-4,05) |
| chronisch medicijngebruik | 136 | 1,30 (0,92-1,82) |
| excessief alcoholgebruik | 253 | 1,24 (0,97-1,60) |

Indien een afwijking met duidelijke oorzaak gevonden wordt is therapie mogelijk. Een varicokèle kan chirurgisch behandeld worden, een prostatitis kan met antibiotica behandeld worden. Als de behandeling echter faalt of als er geen oorzaak bekend is voor de infertiliteit, blijft een grote groep patiënten over, waar geen gangbare behandeling voor mogelijk is.

In-Vitro-Fertilisatie (IVF) als behandeling voor mannelijke infertiliteit.

IVF is begonnen als een behandeling voor vrouwelijke infertiliteit t.g.v. afgesloten eileiders. De eerste resultaten hierbij waren bemoedigend en al snel werd ook aan de mogelijkheid van IVF gedacht bij de behandeling van andere vormen van infertiliteit. Gezien het grote aantal paren waarbij sprake is van mannelijke infertiliteit of van de combinatie van mannelijke en vrouwelijke infertiliteit werden ook deze paren m.b.v. IVF behandeld.

In onze kliniek is het momenteel gangbaar dat paren met mannelijke infertiliteit voor IVF in aanmerking komen als sprake is van tenminste twee jaar infertiliteit op basis van een andrologische factor. De overige andrologische behandelingen moeten daarbij geen zin of geen resultaat hebben gehad.

In dit proefschrift zal geprobeerd worden een overzicht te geven van de behandeling van mannelijke infertiliteit met behulp van IVF en zullen enkele nieuwe technieken geïntroduceerd worden als hulp bij de behandeling.

In hoofdstuk 3 wordt een overzicht gegeven van de resultaten verkregen bij man-

INLEIDING

nelijke infertiliteit met behulp van IVF op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt ziekenhuis.

In de hoofdstukken 4 t/m 8 wordt de introductie van nieuwe methoden bij de IVF-behandeling besproken. In hoofdstuk 4 wordt de Percoll-methode van zaadscheiding behandeld en in de hoofdstukken 5 t/m 8 de micro-inseminatie.

Omdat de micro-inseminatie een geheel nieuwe techniek was, werd met deze methode eerst in een diermodel geëxperimenteerd (hoofdstuk 7). Daarna werd een aanvraag ingediend bij de Medisch Ethisch Commissie van het Dijkzigtziekenhuis om de techniek ook bij de mens toe te mogen passen. Deze aanvraag en de beschrijving van de micro-inseminatie bij patiënten staan vermeld in hoofdstuk 8.

Als eerste volgt nu echter hoofdstuk 1, waarin de gameten, zaadcellen en eicellen, en de bevruchting besproken worden. Daarna zullen in hoofdstuk 2 enkele aspecten van de geschiedenis van de voortplantingsbiologie en de IVF beschreven worden.

REFERENTIES

Comhaire FH, Kretzer de, Farley TMM, Rowe PJ. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J of Androl* 1987; Supplement 7.

Mosker W. Infertility trends among US couples 1965-1976. *Family Planning Perspectives* 1982; 14: 22.

Vaessen M. Childlessness and infecundity. WFS. Comparative studies nr 31. International Statistical Institute. Voorburg, Netherlands, 1984.

GAMETEN EN DE BEVRUCHTING

Bevruchting bij zoogdieren is de interactie tussen zaadcel en eikel gevolgd door de vorming van een embryo. Zaadcel en eikel zijn beide zeer gespecialiseerde, gedifferentieerde haploïde cellen die samen een reeks van veranderingen ondergaan leidend tot de vorming van één diploïde cel. Deze cel zal zich door groei en differentiatie ontwikkelen tot een embryo en tenslotte een nakomeling.

Bij de mens worden de eerste twee maanden van de ontwikkeling de embryonale periode genoemd. De periode tussen het begin van de derde maand en de geboorte wordt de foetale periode genoemd (Langman, 1976).

De zaadcel en de eikel hebben beide al een lange ontstaansgeschiedenis achter de rug voordat zij bij de bevruchting betrokken worden. De eerste stadia van de gameetvorming vinden namelijk al plaats in het zeer jonge embryo bij de vorming van de oerkiemcellen.

1.1 OERKIEMCELLEN

De oerkiemcellen worden bij de mens voor het eerst waargenomen bij het 24 dagen oude embryo (Eddy, 1981), ze bevinden zich dan nog buiten het embryo in de wand van de dooierzak, vlak bij het allantois. Vanaf deze plaats migreren de oerkiemcellen naar de geslachtsplooiën. Deze kiemcellen hebben zich ontwikkeld uit primitieve ectodermale cellen van de embryoblast of 'inner cell mass' (Gardner, 1985).

Bij embryo's van de muis zijn oerkiemcellen aangetoond zeven dagen post coïtum (Ginsburg, 1990). Op dat moment kunnen ongeveer 8 oerkiemcellen aangetoond worden. Acht dagen post coïtum zijn er al ongeveer 125 oerkiemcellen te vinden. De meeste van deze oerkiemcellen migreren dan naar mesoderm en endoderm.

Bij de mens migreren de oerkiemcellen in de vijfde week na de ovulatie naar de geslachtsplooiën (Satoh, 1991).

Tijdens de periode gedurende welke de geslachtsplooiën zich omvormen tot testis of ovarium, worden de oerkiemcellen oögonia respectievelijk spermatogonia genoemd.

De geslachtsplooiën liggen mediaal naast de mesonephros (voornier) en vormen bij de foetus de gangen van Müller en de gangen van Wolff. Bij de mannelijke foetus zorgt de zogenaamde Müllerian-inhibitory-factor (MIF) voor regressie van de gangen van Müller en verzorgt testosteron de instandhouding van de gangen van Wolff. De MIF wordt aangemaakt door de Sertoli-cellen en testosteron door de interstitiële Leydig-cellen van de foetale testis. Door de afwezigheid van MIF en testosteron bij de vrouwelijke foetus blijven de gangen van Müller intact en gaan de gangen van Wolff te gronde. De gangen van Wolff ontwikkelen zich tot epididymis, ductus deferens en vesiculæ seminales, de gangen van Müller tot de tubae, de uterus en het bovenste derde deel van de vagina (Jost, 1953; Jost, 1972).

HOOFDSTUK 1

De oerkiemcellen zijn diploïde cellen die zich mitotisch delen en een hoge concentratie alkalische fosfatase en glycogeen in het cytoplasma bezitten (McKay,1953). Door amoëboïde bewegingen migreren ze van de dooierzak naar de geslachtsplooiën. Het is waarschijnlijk dat de migratie veroorzaakt wordt door chemotaxis, mogelijk speelt het fibronectine hierbij een rol (French-Constant,1991).

Het humane embryo bezit 24 dagen na de conceptie ongeveer 200 tot 300 oerkiemcellen. Door mitotische delingen zijn er bij de vrouwelijke foetus ongeveer 1700 oögonia na de migratie in de geslachtsplooiën aanwezig. In de tweede maand van de zwangerschap bezit de vrouwelijke foetus ongeveer 600.000 oögonia en in de vijfde maand zijn er bijna 7.000.000. Hierna daalt het aantal oögonia snel tot ongeveer 2.000.000 bij de geboorte (Baker,1982).

Een verklaring voor de terugval van zeven miljoen naar twee miljoen oögonia is het optreden van atresie, vele oögonia degenereren. Bovendien is crossing-over tussen de homologe chromosomen die in het zygoten- en pachteenstadium plaatsvindt een risicovolle gebeurtenis. Chromosomale breuken en andere fouten in deze stadia leiden tot een vroegtijdige degeneratie van de oöcyten (Byskov,1982).

Na 9 maanden hebben alle oögonia zich omgevormd tot primaire oöcyten in het diploten stadium van de profase van de eerste meiotische deling. Na de geboorte neemt het aantal primaire oöcyten niet meer toe.

Bij het mannelijk embryo delen de oerkiemcellen zich via mitotische delingen tot aan de puberteit in beperkte mate verder. Ze zijn wel in staat om de meiotische delingen aan te vangen, maar bereiken dan slechts het preleptoten stadium van de profase van de eerste meiotische deling. Net voor de puberteit vindt de start plaats van nieuwe mitotische delingen van de spermatogonia. De mitotische delingen worden voortgezet terwijl een deel van de spermatogonia aan de meiotische delingen begint (Byskov,1982).

Achtereenvolgens zullen nu verder de ontwikkeling van de eicel, de ontwikkeling van de zaadcel en de bevruchting worden besproken.

1.2 OÖGENESIS EN OVULATIE

De eerste beschrijving van de vrouwelijke genitalia interna die we kennen is van Aristoteles (384-322 v.Chr.). Hij gaf een beschrijving van de uterus maar herkende de ovaria niet als aparte organen. Hij ontwikkelde de zaad en aarde theorie. De man was de donor van het zaad dat in het menstruele coagulum 'gezaaid' werd. Het zaad zou uitgroeien tot een ei, dat zich ontwikkelt tot een foetus (Thompson,1910).

De eerste beschrijving van de ovaria werd gegeven door Herophilus van Alexandrië in ca. 300 voor Christus. Hij herkende de ovaria als afzonderlijke organen maar had geen idee van hun functie. Pas in de 16de eeuw werd voor het eerst opnieuw het ovarium bestudeerd. Het waren Andreas Vesalius in zijn boek 'De humani corporis Fabrica libri septem' (1555), Fallopius in zijn 'Observationes anatomicae' (1562) en Fabricius in zijn 'De Formato Foetu' (1604) die voor het eerst de structuur van het ovarium beschrijven. Zij beschrijven o.a. de follikels en de corpora lutea.

Het duurde echter tot 1672 alvorens Reinier de Graaf de functie van het ovarium ontdekte. Hij beschreef in zijn boek 'De mulierum organis generationi inservientibus' (1672) dat de eicellen uit het ovarium afkomstig zijn. Hij dacht nog dat de hele follikel

('Graafse follikel') het ei vormde. Zijn belangrijkste vondst is het feit dat bij het konijn na de ovulatie de ovariële follikels tot corpora lutea worden omgevormd.

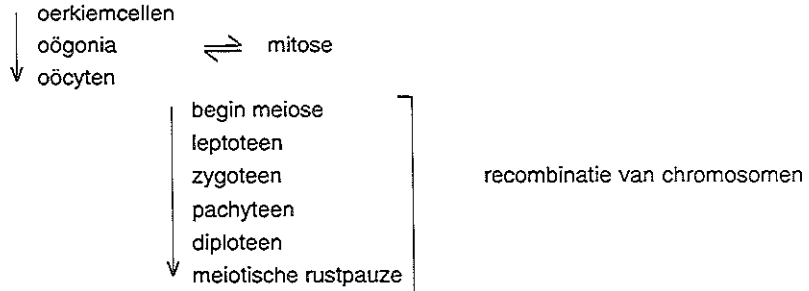
Pas in 1827 werd de relatie tussen follikel en eicel correct beschreven door Karl Ernst von Baer in zijn 'De ovi mammalium et hominis genesi'. Na de ontdekking van zaadcellen door Antoni van Leeuwenhoek in 1675 (Leeuwenhoek, 1678) duurde het dus nog bijna 150 jaar tot de eicellen werden ontdekt door von Baer.

1.2.1 Aanzet tot de meiotische deling

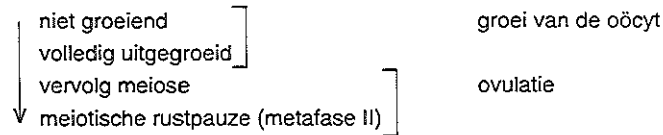
De oögonia ontwikkelen zich in de foetale periode tot primaire oöcyten, oöcyten in de profase van de eerste meiotische deling.

Deze primaire oöcyten doorlopen eerst het preleptoteenstadium, waarin de DNA replicatie plaatsvindt. Via het leptoteen- en zygoteenstadium, waarin homologe chromosomen paren en een synapse vormen, komen ze in het pachyteenstadium terecht. Tijdens dit stadium vinden crossing-over en recombinatie plaats. Uiteindelijk komen de oöcyten in het diploteenstadium terecht (ook wel het kiemblaasstadium genoemd). Dit is voor de oöcyt voorlopig een eindstadium. De chromosomen liggen in uitgerekte toestand, diffuus verspreid in de nucleus te wachten op het vervolg van de eerste meiotische deling. Het signaal hiervoor is een hormonale stimulus uit de hypofyse. Het is ook mogelijk oöcyten de eerste meiotische te laten voltooien door ze te isoleren uit hun follikels en over te zetten in kweekmedium (Pincus, 1935; Wassarman, 1979).

foetus



post-partum



onbevuchte oöcyt



embryo

Figuur 2.1 Oögenese bij de muis (naar Wassarman P, The mammalian ovum. The physiology of reproduction, Ed by E. Knobil and J. Neill et al. Raven Press. New York, 1988)

Bij de mens, maar ook bij de muis, de rat, de cavia en vele andere diersoorten hebben de meeste eicellen aan het eind van de foetale periode het diploteenstadium bereikt. Zij blijven in dit stadium tot aan het begin van de eicelrijping tijdens het volwassen leven of totdat ze atresie ondergaan. Bij de mens zijn de eicellen dus jaren in hun 'rust-fase' voordat de meiose wordt voortgezet.

1.2.2 Vorming van de Graafse follikel

De primaire oöcyten worden eerst omgeven door een enkele laag plaveisel-epitheel maar deze laag transformeert zich tot één laag kubische cellen. De oöcyten bevinden zich dan in een zgn. primordiale follikel. Deze granulosa-cellen delen zich tijdens de verdere groei van de oöcyt totdat er drie lagen rond de eicel aanwezig zijn.

Tijdens het diploteenstadium groeit de oöcyt, zowel vòòr als tijdens de follikel-groei. Bij de muis neemt de diameter van de eicel toe van 12 µm tot 80 µm (Wassarman, 1988). Bij de mens is de diameter van de eicel ± 20 µm voor de groei en is ± 100 µm bij een volledig uitgroeide eicel (Veeck, 1986).

Tijdens de follikelgroei vormen zich holten tussen de granulosa-cellen, die zich vullen met vocht en uiteindelijk samensmelten tot één follikelholte, het antrum. De Graafse follikel is dan gevormd. De eicel wordt naar één kant van de follikel gedreven en wordt aan de kant van het antrum omgeven door enkele lagen granulosa-cellen, de secundaire follikel. Door verdere vochtophoping in het antrum wordt de laag granulosa-cellen langs de wand van de follikel dunner, behalve rond de eicel. De eicel blijft omgeven door een compacte laag granulosa-cellen, de cumulus oöphorus. De cumulus is via een steel van granulosa-cellen verbonden met de granulosa-cellen van de follikelwand (Baker, 1982).

Rondom de zich ontwikkelende follikel groeien capillairen het ovariële stroma in en vormen daar een laag die de voeding van follikel en eicel verzorgt, de theca interna. Deze laag wordt op zijn beurt weer omgeven door een laag van fibroblasten die de theca externa vormen.

Follikelontwikkeling vindt al plaats in de foetale periode. Deze ontwikkeling eindigt echter in atresie. Pas vanaf het begin van de puberteit groeien follikels verder uit en vindt ovulatie plaats.

De groei van een follikel in het beginstadium tot ongeveer 40 granulosa-cellen lijkt gonadotrofine-onafhankelijk te zijn (Peters, 1973). Er zijn echter maar weinig follikels die zich verder kunnen ontwikkelen na hypofysectomie (Lunenfeld, 1975).

Verdere groei van de follikel is afhankelijk van stijgende spiegels FSH en LH. De rijpsdelingen van de oöcyt zijn hormoon-onafhankelijk (Pincus, 1935; Eppig, 1979).

1.2.3 Het aantal groeiende follikels

De miljoenen primordiale follikels in de menselijke foetus verdwijnen voor een groot deel door atresie. Aan het begin van de puberteit zijn er nog een paar honderdduizend primordiale follikels aanwezig. Dit aantal neemt gestaag af, voornamelijk door atresie (tabel 1.1).

GAMETEN EN DE BEVRUCHTING

Tabel 1.1: Aantallen primordiale en groeiende follikels in het menselijk ovarium op verschillende leeftijden (Block,1952)

| Leeftijd | # primordiale follikels | # groeiende follikels |
|----------|-------------------------|-----------------------|
| 6-15 | 439.000 | 11.300 |
| 16-25 | 159.000 | 6.600 |
| 26-35 | 59.000 | 4.100 |
| 36-45 | 34.000 | 4.200 |

Bij de geboorte zijn, zoals boven vermeld, in het ovarium vaak al groeiende follikels te zien, maar pas bij de juiste hormonale spiegels na het begin van de menstruele cyclus in de puberteit leidt follikelgroei tot ovulatie.

Bij sommige species als de muis en de hamster is op ieder moment van de menstruele cyclus een vast aantal groeiende primordiale follikels aanwezig, het aantal follikels met een antrum fluctueert echter, aan het begin van de cyclus zijn er het meest, na de ovulatie is hun aantal het laagst (Pedersen,1970). Bij vele species varieert echter zowel het aantal primordiale follikels als het aantal antrale follikels (Greenwald,1988).

Tijdens het leven van de vrouw zullen ongeveer 400 tot 500 ovulaties plaatsvinden. Samen met de ovulerende follikel zijn er altijd zo'n 20 andere follikels die zich ook ontwikkelen. Deze degenereren echter op het moment dat zij zich moeten omvormen tot een Graafse follikel. Het totaal aantal groeiende follikels in een cyclus is afhankelijk van de hoeveelheid beschikbaar FSH en LH tijdens die cyclus (Baker,1982).

De FSH- en LH-spiegels bepalen niet alleen het aantal follikels dat zich ontwikkelt tot Graafse follikels, maar ook het aantal follikels dat uiteindelijk zal ovuleren (Gougeon,1984).

Op het eind van de rijpingsperiode van de follikel leidt een stijgende oestrogeenproductie tot een sterke stijging van de LH-spiegel. De LH-stijging zet de granulosacellen aan tot een laatste golf van mitotische delingen, de voltooiing van de meiose, de follikelsprong en de luteïnisatie van de granulosacellen.

1.2.4 Vervolg van de eerste meiotische deling en de ovulatie

De oöcyt in de preovulatoire follikel wordt door de preovulatoire FSH- en LH-stijging aangezet tot voltooiing van de eerste meiotische deling. In vitro kunnen oöcyten ook in afwezigheid van gonadotrofinen de meiose voortzetten (Chang,1955). Als de eicel een bepaalde grootte bereikt heeft is deze in staat de meiose voort te zetten. Dit geschiedt in twee stappen. Ten eerste de afbraak van de membraan van de kiemblaas en de ontwikkeling tot metafase I en ten tweede de voortgang van metafase I naar metafase II (Sörensen,1976).

Tijdens het verdwijnen van de kiemblaas condenseren de chromosomen, het chromatine wordt heterochromatisch en de chromosomen komen circulair in het midden van de cel, in de equator van de metafase I spoel te liggen.

Bij de daaropvolgende metafase I rangschikken de chromosomen zich paarsgewijs in het midden van de meiotische spoel. De meiotische spoel ligt op dat moment in de periferie van de eicel onder de celmembraan. Tijdens anafase I bewegen de chromosomen zich naar de polen van de spoel. De meiotische spoel die eerst evenwijdig (tan-

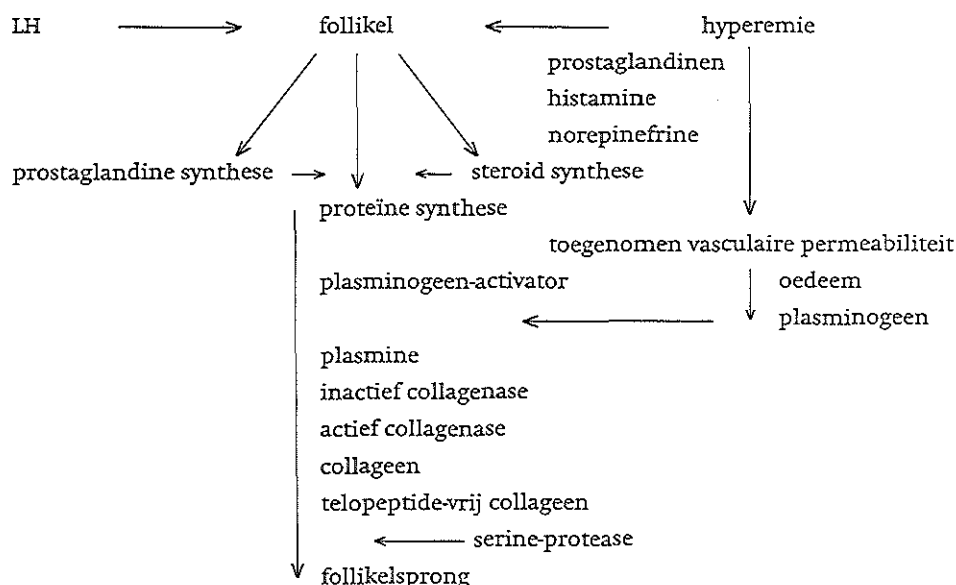
gentieel) aan het eicel-oppervlak ligt draait 90. Tijdens de telofase splitst zich dan het eerste poollichaampje af. Dit bevat de helft van het aantal gerecombineerde chromosomen en een klein deel van het cytoplasma.

De eicel gaat onmiddellijk verder met de tweede meiotische deling en stopt bij metafase II, als de chromosomen in het midden van de tweede meiotische spoel zijn gaan liggen. Nu vindt de ovulatie plaats en de tweede meiotische deling zal pas voltooid worden als de eicel bevrucht wordt.

In vitro is geen hormonale stimulus nodig om zoogdiereicellen uit hun rustfase, het kiemblaasstadium, te halen en de meiotische deling te voltooien. Bekend is dat dit stadium in stand gehouden wordt door een hoge intra-cellulaire concentratie cAMP (Eppig,1985).

Tijdens de groei van de eicel spelen 'gap junctions' tussen eicel en omliggende granulosa cellen en rol bij het metabolisme van de eicel. Op het einde van de eicelrijping gaat de afbraak van de kiemblaas gelijk op met een sterke vermindering van het aantal 'gap junctions' en met cumulusexpansie. Dit geschiedt allemaal vlak voor de ovulatie (Eppig,1982).

Bij de ovulatie varieert de diameter van de eicel bij verschillende zoogdieren van 70 μm bij de muis tot 120 μm bij de mens. De ovulatie wordt in gang gezet door een stijging van de LH-spiegel, de preovulatoire LH-piek. De preovulatoire follikel wordt hyperemisch, proteïne- en prostaglandinesynthese worden verhoogd en een cascade van reacties volgt, eindigend met de afbraak van collageen in de follikelwand en de follikelsprong (Lipner,1988) (zie figuur 1.2).



Figuur 1.2 Ovulatiehypothese naar Lipner (Lipner,1988).

Het tijdsinterval tussen de LH-piek en de ovulatie ligt vast, voor de mens is dit 36 tot 48 uur, bij de muis 12 tot 15 uur. De geovuleerde eicel wordt opgevangen door de uiteinden van de tuba Fallopi en de follikel wordt getransformeerd tot een nieuwe endocriene klier, het corpus luteum.

1.2.5 Opbouw van celorganellen van de oöcyt die een rol spelen bij de bevruchting.

Een belangrijke rol bij de bevruchting spelen de corticale granulae en de zona pellucida. De corticale granulae zijn tijdens de groei van de oöcyt ontstaan uit het Golgi-complex, zij zijn gelokaliseerd vlak onder de plasmamembraan en gelijken het meest op lysosomen. Als de eicel door een zaadcel geactiveerd wordt, fuseren ze met het oölemma en door het vrijkomen van hun inhoud in de perivitelline ruimte, veranderen ze de functionele eigenschappen van de zona pellucida en de eicelmembraan zodat polyspermie voorkomen wordt (Gulyas,1980).

De zona pellucida komt alleen voor bij de eicellen van zoogdieren. De zona heeft verschillende functies voor de eicel. De zona is verantwoordelijk voor de species-specifieke eicel-zaadcel interactie bij de bevruchting (Yanagimachi,1981). De zona vormt voorts een belangrijke blokkade tegen polyspermie (Wolf,1981) en de zona beschermt het embryo als het door het oviduct getransporteerd wordt (Mintz,1962). Tegelijkertijd met de groei van de eicel wordt de zona aangelegd. Na voltooiing van de groei en na de ovulatie vindt geen synthese meer plaats van de bestanddelen van de zona binnen de eicel (Shimizu,1983).

De eicel is in staat om alle eiwit bestemd voor de zona zelf aan te maken (Bleil,1980b). Het is echter ook mogelijk dat de granulosacellen voor een deel bijdragen aan de zona pellucida (Leveille,1987).

De zona pellucida is eerst herkenbaar als afzonderlijke klompjes materiaal gelegen tussen de microvilli van de oöcyt en de omgevende granulosacellen. De ontwikkeling van de zona gaat verder met de opbouw van discontinue stukjes die pas na enige tijd samensmelten tot één membraan om de eicel. Met de groei van de zona vindt de vorming en de polymerisatie plaats van het glycoproteïne netwerk waaruit de zona bestaat. De zona wordt in dit stadium doorboord door vele microfilamenten, waarin zich cytoplasmatische uitlopers van de granulosacellen bevinden. In het preovulatoire stadium trekken deze uitlopers zich terug uit de zona (Dietl,1989).

De rijpe zona pellucida bezit, zoals te zien m.b.v. een elektronenmicroscop, aan de buitenkant een poreus oppervlak en aan de binnenkant een glad oppervlak. De zona is permeabel voor grotere moleculen en virussen (Bleau,1989).

Het is het meest waarschijnlijk dat de glycoproteïnen van de zona worden aangeemaakt zoals alle overige glycoproteïnen (Dietl,1989), namelijk door aanmaak in het endoplasmatisch reticulum en modificatie in het Golgi-apparaat. Daar worden ze opgeslagen in secretoire granulae die samensmelten met de celmembraan en via exocytose in de extracellulaire ruimte worden uitgescheiden (Kornfeld,1980). De zona bestaat uit een laag van glycoproteïnen. Bij de muis is de zona 7 µm dik en bezit 3-4 ng eiwit (Shimizu,1983), bij het varken is de zona 16 µm dik en bezit 30 ng eiwit (Dunbar,1981).

Bij het varken zijn vier verschillende families glycoproteïnen in de zona herkenbaar, genaamd ZP1 t/m ZP 4 (Sacco,1986), bij de hamster drie, ZP1 t/m ZP3 (Ahuja,1983)

en bij de muis eveneens drie glycoproteïnen, ZP1, ZP2 en ZP3 (Bleil,1980a). Door het werk van Bleil en Wassarman is van de glycoproteïnen van de zona van de muize-eicel het meest bekend, zowel qua opbouw als qua functie. De glycoproteïnen ZP1, ZP2 en ZP3 van de muis hebben een molecuulgewicht van resp. 200 kD, 120 kD en 83 kD.

De zona is opgebouwd uit onderling verbonden filamenten. De filamenten bestaan uit een zich herhalende dimeer van ZP2 en ZP3. De verbindingen tussen de filamenten bestaan uit ZP1. ZP1 is een dimeer bestaande uit twee identieke polypeptideketens (Wassarman,1989).

ZP3 is het glycoproteïne dat de zaadcel bindt aan de zona. Het bestaat uit een polypeptideketen van 402 aminozuren (44 kD), drie of vier N-gebonden oligosacchariden en een nog niet bepaald aantal O-gebonden oligosacchariden. De O-gebonden oligosacchariden bepalen de species-specifieke zaadcelbinding aan de zona (Wassarman,1989).

Bij de mens zijn in de zona twee complexen van glycoproteïnen gevonden, één van 92-120 kD (ZP1,2) en één van 57-73 kD (ZP3). Na verdere dissociatie bleek het eerste complex uit twee delen van resp. 97 kD (ZP1) en 82 kD (ZP2) te bestaan. Shabonowitz en O'Rand vonden dat alle glycoproteïnen van de menselijke zona in staat waren om zaadcellen te binden, ook vonden zij dat bij de zona van bevruchte eicellen de hoeveelheid ZP1 veel lager was. Shabonowitz en O'Rand konden bewijzen dat deze verandering niet veroorzaakt werd door zaadcelbinding aan de zona maar door de corticale reactie (Shabonowitz,1988).

De functie en het gedrag van de zona tijdens de bevruchting worden beschreven in de paragraaf 1.4 'De bevruchting'.

1.3 SPERMATOGENESE EN ZAADCELFUNCTIES

1.3.1 Mitotische en meiotische delingen

De primordiale kiemcellen nestelen zich bij de mannelijke foetus tussen de toekomstige Sertoli-cellen in de zgn 'sex-cords', later zullen dit de tubuli seminiferi worden (Setchell,1982).

Bij de mens vindt tot vlak voor de puberteit geen ontwikkeling of deling plaats van de mannelijke gonocyten. Maar op het moment dat de puberteit begint, migreren de gonocyten naar de basale membraan van de tubuli en gaan zich daar door middel van mitotische delingen vermenigvuldigen. De gonocyten worden vanaf dan spermatogonia genoemd. Deze kunnen zich van type A, naar intermediair en uiteindelijk type B spermatogonia ontwikkelen.

Eén groep spermatogonia, de zgn. stamcellen, blijft op de basale membraan achter, om voor nieuwe populaties spermatogonia te zorgen. Nieuw gevormde type A spermatogonia, die afkomstig zijn van één moedercel zijn herkenbaar door hun onderling contact via cytoplasmatische bruggen.

Na de laatste mitotische deling van de B spermatogonia wordt het DNA weer verdubbeld, maar in plaats van een mitotische deling gaat de cel, nu primaire spermatocyt geheten, beginnen aan de eerste meiotische deling.

De primaire spermatocyt komt vrij van de basale membraan en deelt zich tot twee secundaire spermatocyten, die haploïd zijn. Ieder chromosoom van een secundaire

spermatocyt bezit een verdubbelde DNA streng. Deze secundaire spermatocyt deelt zich bij de tweede meiotische deling tot twee haploïde spermatiden (Setchell, 1982). Uit iedere primaire spermatocyt ontstaan dus na twee meiotische delingen vier spermatiden, die alle genetisch verschillend zijn als gevolg van de recombinatie van DNA strengen tijdens de meiose.

1.3.2 Spermiogenese

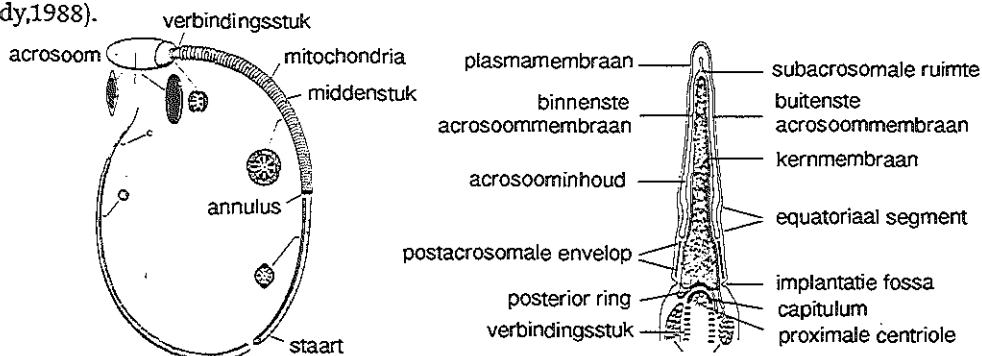
De postmeiotische rijping van de zaadcel wordt de spermiogenese genoemd. De spermatide ondergaat een condensatie van zijn kern, het Golgi-apparaat vormt een blaasje dat zich om één zijde van de kern stult, twee centriolen migreren naar de andere zijde van de kern en groeien uit tot de staart.

Bij het vrijkomen van de zaadcel wordt een groot deel van het cytoplasma van de spermatide achtergelaten en gefagociteerd door de Sertolicel. Een klein fragment cytoplasma 'the cytoplasmic droplet', blijft rond de nek van de zaadcel achter. Dit deel zit vol mitochondriën.

1.3.3 Opbouw van de rijpe zaadcel

Een zaadcel (spermatozoo) bestaat uit twee componenten: de kop en de staart. De lengte van een zaadcel varieert bij de verschillende species van 50 μm bij de mens tot 150 μm bij knaagdieren.

De kop bestaat uit de nucleus, die een haploïd aantal chromosomen bezit en zeer gedecondenseerd is en het acrosoom, een grote secretoire granule die om het voorste deel van de nucleus ligt. De kop is bij de mens 5 μm lang, 2,5 μm breed en 1,5 μm dik. De staart bestaat uit een centraal axonema, een geordend complex van microtubuli omgeven door stevige vezels die van de zaadcelkop tot aan het eind van de staart lopen. In het voorste deel van de staart wordt het axonema omgeven door een bundel mitochondriën. De gehele zaadcel wordt omgeven door de plasma-membraan. Het voorste deel van de kop wordt omgeven door drie membranen, van binnen naar buiten: binnenste acrosoommembraan, buitenste acrosoommembraan, plasmamembraan (Eddy, 1988).



Figuur 1.3 Opbouw van de zaadcel en de zaadcelkop (naar B.P. Setchell. *Spermatogenesis and spermatozoa*. Uit *Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization*. Ed by C.R. Austin and R.V. Short. Cambridge University Press. Cambridge, 1982)

1.3.4 De zaadcelcyclus

De produktie van spermatozoa is een cyclisch proces, op één bepaald tijdstip is op één plaats in een tubulus seminiferus één cohort zaadcellen te vinden. Dit cohort bestaat uit vijf typen cellen die altijd tezamen gevonden worden. In één cyclus ontwikkelen de jongste zaadcellen uit dit cohort tot het één na jongste stadium. Er zijn dus 4 cycli nodig om een type A spermatogonium uit te doen groeien tot een zaadcel.

Bij de mens duurt een cyclus 16 dagen, het gehele proces duurt dan $4 \times 16 = 64$ dagen. Voor de ontwikkeling van een stamcel tot een type A spermatogonium moet 8 dagen gerekend worden, dus de totale ontwikkeling duurt 4,5 cycli.

Behalve deze cyclische veranderingen zijn er op verschillende plaatsen in de tubuli verschillende cohorten zaadcellen te zien. Een bepaald stuk tubulus laat de stadia zien van zaadcellen uit vier cycli, in het stuk tubulus daarnaast worden ook vier cycli gezien maar dan van een ander cohort zaadcellen. Ieder stuk tubulus heeft zo zijn eigen vier cycli en dit stuk loopt altijd even ver in zaadcelontwikkeling voor of achter op de belendende stukken. Langs de tubulus zijn zo altijd de verschillende stadia binnen een cyclus herkenbaar, de volgorde in stadia over de tubulus blijft altijd hetzelfde. Bij de mens zijn de stukjes echter zo kort dat een volgorde bijna niet herkenbaar is (Clermont,1972).

1.3.5 Hormonale beïnvloeding van de spermatogenese

Testosteron stimuleert via de Sertoli-cellen de deling van de spermatogoniën en het voltooien van de reductiedeling (Skinner,1991). Testosteron wordt geproduceerd door de Leydig-cellen en passeert door actieve diffusie de bloed-testis-barrière. In de tubuli wordt een hogere testosteronspiegel opgebouwd dan in het bloed. De hogere spiegel kan de spermatogenese op een voldoende niveau handhaven (Setchell,1982).

De Sertoli-cel in vitro bezit een receptor voor FSH en algemeen wordt aangenomen dat FSH een rol speelt bij de initiëring van de spermatogenese. Wat de rol is van FSH bij handhaving van de zaadcelproductie is echter onzeker. Bij volwassen ratten is kort na een hypofysectomie testosterontoediening voldoende voor het onderhouden van de spermatogenese (Nelson,1940).

1.3.6 De epididymis

Door passief transport van door de Sertoli-cellen geproduceerde vloeistof worden de zaadcellen getransporteerd naar het rete testis en via de ductuli efferenti komen de zaadcellen uiteindelijk in de epididymis terecht.

De epididymis is een lange, sterk gewonden ductus, waarin de zaadcellen door de stroom vloeistof vanuit de testis, door peristaltische contracties van de gladde spierlaag en door het trilhaarepitheel in de wand richting vas deferens gestuwd worden (Bedford,1975). Het vas deferens bezit een dikke spierlaag die uitkomt in een verwijd deel, de ampulla. Bij een ejaculatie stuwen peristaltische contracties de zaadcellen vanuit het vas deferens de ampulla in op weg naar de urethra.

De transporttijd van de zaadcellen in de epididymis bij de man bedraagt twaalf dagen (Rowley,1970). Deze tijd kan verkort worden door een verhoogde frequentie van

ejaculatie, zoals bij de ram aangetoond door Amir (Amir,1986) en door een verhoogde temperatuur van de epididymis, wat Bedford heeft laten zien bij de rat en het konijn (Bedford,1978). Hij plaatste de epididymis in de buikholte van het proefdier en kon daarmee aantonen dat de transporttijd verkort werd maar dat de zaadcellen niets van hun fertiliserend vermogen verloren. Dit in tegenstelling tot een verhoging van de temperatuur van de testis. De overmaat van zaadcellen die geproduceerd wordt door de testis en die niet geëjaculeerd wordt, wordt voor het grootste deel met de urine uitgescheiden en het overige deel wordt gefagocyteerd (Lino,1967; Phadke,1964).

Tijdens de passage van de epididymis ondergaan de zaadcellen een rijpingsproces. Hoewel niet alle zaadcellen de epididymale rijping nodig hebben om te kunnen bevruchten, zoals aangetoond in IVF-experimenten bij de mens (Jequier,1990), verkrijgen de meeste zaadcellen tijdens de passage hun motiliteit en vinden enkele belangrijke veranderingen in de plasmamembraan plaats (Yanagimachi,1988).

Door de secretoire activiteit van verschillende delen van de epididymis wordt de plasmamembraan van de zaadcel tijdens passage steeds wat veranderd. Een duidelijke aanwijzing hiervoor is de toename in het vermogen van zaadcellen om aan de zona te hechten als de zaadcellen de epididymis passeren (Saling,1981).

Tijdens de passage worden nieuwe glycoproteïnen aan de plasmamembraan gebonden en worden de aanwezige glycoproteïnen veranderd (Tezon,1985). Het is vooral de plasmamembraan gelegen rond de zaadcelkop waar vele nieuwe glycoproteïnen gebonden worden (Yanagimachi,1985). De zaadcellen verkrijgen daar ook hun motiliteit. Bij sommige species als b.v. de rat gaat dit geleidelijk, bij de mens is het moeilijker om zo'n overgang te lokaliseren. Het verwerven van motiliteit zou hier meer afhankelijk kunnen zijn van de leeftijd van de rijpende zaadcellen dan van de lokalisatie in de epididymis.

Zaadcellen die de testis verlaten zijn altijd onbeweeglijk, pas na verwijdering van de plasmamembraan en toevoeging van ATP, CAMP en Mg^{2+} verkrijgen deze hun motiliteit (Mohri,1980).

De morfologie van de zaadcel verandert tijdens passage van de epididymis, de 'cytoplasmic droplet' schuift van de hals naar het middenstuk van de zaadcel en gaat uiteindelijk verloren. In vele species, behalve bij de mens, veranderen ook de vorm en de grootte van het acrosoom (Yanagimachi,1988).

De concentratie zaadcellen wordt tijdens transport van de zaadbuisjes in de testis (tubuli seminiferi) naar de ductus deferens steeds hoger. De oorzaak hiervoor ligt in de absorptie van water, bij de mens vindt deze voornamelijk in de ductuli efferenti plaats. De inhoud van de epididymis is dan ook hyperosmolair t.o.v. het bloed (D'Adario,1980).

Bij de ejaculatie worden zaadcellen uit de epididymis en de ductus deferens gemengd met het seminale plasma, afkomstig uit de vesiculae seminales, de prostaat en de glandulae bulbo-urethrales.

Het volume dat zaadcellen uit epididymis en vas deferens bijdragen aan het ejaculaat bedraagt ongeveer 0,2 ml. De bijdrage van de verschillende organen die tezamen het ejaculaat vormen, en enkele belangrijke biochemische bestanddelen zijn vermeld in Tabel 1.2.

HOOFDSTUK 1

Tabel 1.2: Bijdrage van verschillende organen van de genitalia interna van de man aan het ejaculaat, en de belangrijkste chemische bestanddelen (Lundquist,1949)

| Orgaan | % bijdrage aan ejaculaatsvolume | Bestanddelen |
|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| Testis | 5% | Testosteron Androgeen bindend proteïne Transferrine |
| Epididymis en ductus deferens | | Carnitine Inositol Lipiden Motiliteits-proteïne |
| Vesiculae seminales | 46-80 % | Fructose Prostagladinen Vesiculase |
| Prostaat | 13-33 % | Protease Zure fosfatase Citraat Calcium, zink Vesiculase |
| Bulbo-urethrale en urethrale klieren | 2-5 % | Mucoproteïnen IgA |

Het ejaculaat wordt in fracties geproduceerd. Door een zgn. splitejaculatie kunnen de verschillende fracties bestudeerd worden (Eliasson,1959). Het aantal zaadcellen in de eerste fracties is hoger dan in latere fracties (Amelar,1965).

Binnen vijf minuten na de ejaculatie coaguleert het seminale plasma. In vivo geschiedt dit voor de cervix. Zaadcellen krijgen op deze wijze de kans om de cervix binnen te dringen, en worden beschermd tegen het zure milieu van de vagina. Na één uur wordt het coagulum afgebroken door proteolytische enzymen in ejaculaat (Harper,1988).

1.3.7 Zaadcelaantallen en zaadcelpassage door de vrouwelijke genitalia interna

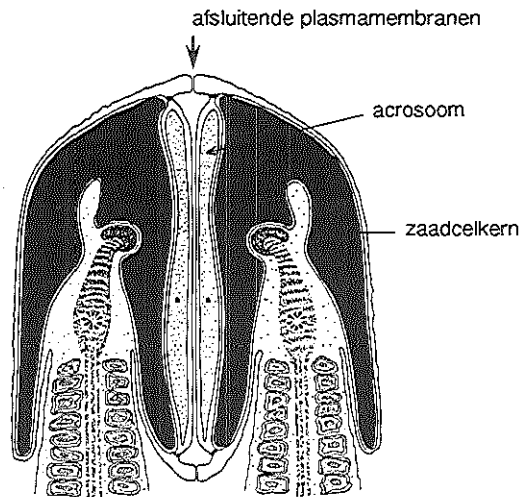
Het is opmerkelijk dat voor de bevruchting van slechts enkele eicellen een veel groter aantal zaadcellen nodig is. Tijdens de evolutie is de overgang van uitwendige bevruchting, zoals bij vissen, naar de inwendige bevruchting, zoals bij zoogdieren, wel samengegaan met een sterke reductie van het aantal eicellen, maar niet met die van het aantal zaadcellen.

Bij runderen en schapen worden meer dan 10^9 zaadcellen geëjaculeerd terwijl er maar één of twee eicellen bevrucht kunnen worden. Ook bij zoogdieren die polyovulair zijn, zoals ratten en konijnen zijn er 100×10^6 zaadcellen beschikbaar voor ongeveer 10 eicellen. Bij de mens zijn gemiddeld 500×10^6 zaadcellen per ejaculaat aanwezig om één eicel te bevruchten. Wat de reden van deze ongelijkheid kan zijn is onduidelijk. Er zijn verschillende speculaties gemaakt over de hoge concentraties zaadcellen.

Cohen beweert dat er een correlatie bestaat tussen de frequentie van het voorkomen van crossing-over tijdens de meiotische deling en het aantal zaadcellen (Cohen, 1967). De hoge aantallen zaadcellen zijn een weerspiegeling van het grote aantal fouten dat tijdens de meiose ontstaat. De vrouwelijke tr. genitalis zou een voorselectie maken van chromosomaal goede zaadcellen.

Bekend is dat de zaadcellen in de vrouwelijke tr. genitalis geselecteerd worden op hun individuele motiliteit (Mortimer, 1978) en op hun morfologie (Mortimer, 1982). De zaadcellen die volgens Cohen geselecteerd worden moeten dus ook de beste motiliteit en een normale morfologie bezitten. Brandriff (Brandriff, 1986) heeft echter bewezen dat het percentage chromosomale afwijkingen onder de best beweeglijke zaadcellen even hoog is als onder de slecht-beweeglijke. Dit maakt de veronderstelling van Cohen zeer onwaarschijnlijk. Het idee dat de meeste zaadcellen door hun chromosomale afwijkingen niet in staat zijn tot bevruchting is moeilijk in stand te houden.

Een andere hypothese betreffende het grote aantal zaadcellen werd gemaakt door Bedford (Bedford, 1984). Bedford en medewerkers bestudeerden de voortplanting van de buidelrat *Didelphis virginiana*. Deze buidelrat bezit een relatief laag aantal zaadcellen in zijn ejaculaat (ongeveer 5×10^6 zaadcellen), die twee aan twee gekoppeld zijn. De zaadcellen liggen met de koppen tegen elkaar, met de acrosomen naar elkaar toegekeerd en afgeschermd tegen het milieu van de vrouwelijke tractus genitalis.



Figuur 1.4 Acrosoombescherming bij de buidelrat (*Didelphis virginiana*) (naar Bedford JM, Rodger JC, Breed WG. Why so many mammalian spermatozoa-a clue from marsupials? Proc R Soc Lond 1984; 221: 221-233)

Volgens Bedford en medewerkers is het acrosoom een kwetsbaar organel. Als het beschermd kan worden totdat het in de buurt van een eicel komt, zal het zijn functie, hulp bij penetratie van de cumulus en zona, veel beter kunnen uitvoeren. Hoe beter beschermd, des te minder zaadcellen er nodig zijn om een goede kans op bevruchting te maken.

Het gedrag van de zaadcellen binnen de tractus genitalis van de vrouw is vooral van belang om vast te kunnen stellen, welke veranderingen de zaadcellen ondergaan-

voordat zij bevruchten. In de volgende alinea's zal de interactie tussen zaadcel en tractus. genitalis worden besproken.

Bij de mens wordt het semen geëjaculeerd in de vagina, vlak bij het ostium cervicale externum. Bij knaagdieren, varkens en paarden vindt de ejaculatie direct in de uterus plaats. Het cervicale kanaal vormt bij deze diersoorten geen barrière voor de zaadcellen.

De vagina bezit een zuur milieu ($\text{pH}=5$), voornamelijk door de productie van melkzuur door de Döderlein-bacteriën in de vagina. Het seminaal plasma kan als pH -buffer voor de zaadcellen functioneren. Fox mat dat na de ejaculatie de pH van 4,3 naar 7,2 steeg en dat binnen 4 minuten de pH in de vagina weer zijn normale waarde bereikt had (Fox,1971).

Na de ejaculatie coaguleert het seminale plasma bij primaten binnen één minuut, in het volgend uur wordt dit coagulum afgebroken door proteolytische enzymen uit het ejaculaat. Een zeer klein deel van de zaadcellen is vijf minuten na de inseminatie al aanwezig in het oviduct. Settlege vond 5 tot 45 minuten na inseminatie al aantallen van 4 tot 53 zaadcellen bij patiënten in het cavum Douglassi (Settlege,1973a).

Zaadcellen hebben een snelheid van 2,0 tot 3,0 mm/min. Uit zich zelf zullen ze dus nooit binnen 5 minuten het oviduct kunnen bereiken. Het is waarschijnlijk dat de zaadcellen, die als eerste het coagulum kunnen verlaten, door de omslag van een negatieve naar een positieve druk binnen de vagina tijdens het orgasme (Fox,1970) en door ritmische contracties van vagina, uterus en oviduct, snel het oviduct kunnen bereiken (Fox,1971). De meerderheid van de zaadcellen bereikt de tuba pas veel later, deze zaadcellen zijn dus meer afhankelijk van hun eigen motiliteit.

De cervicale mucus bestaat uit een glycoproteïnematrix, die voor 40% uit oligosacchariden bestaat in de vorm van fibrillen, en uit oplosbare anorganische zouten en eiwitten. De consistentie van deze hydrogel verandert onder invloed van ovariële hormonen. Oestrogenen maken de mucus waterig, zorgen voor de kristallisatie ('ferning') en 'spinnbaarheid'. De oestrogenen reorganiseren de cervicale fibrillen, waarbij parallelle ketens gevormd worden. Hiertussen kunnen de zaadcellen passeren. Progesteron maakt de mucus dikker en veroorzaakt een herschikking van de fibrillen, waardoor zaadcellen veel moeilijker kunnen passeren (Elstein,1971).

Ferning en spinnbaarheid worden algemeen gebruikt als conceptieve en anticonceptieve bepalingen. Zaadcellen kunnen vanaf de 9de cyclusdag de cervicale mucus penetreren, tijdens de ovulatie kunnen de meeste zaadcellen de cervicale mucus passeren en een tot twee dagen na de ovulatie is passage vrijwel onmogelijk (Moghissi,1966).

De meeste zaadcellen blijven zich ophouden in de buurt van de mucosa, motiele zaadcellen komen terecht in de cervicale crypten en de dode zaadcellen worden of gefagocyteerd of vanuit de cervix naar de vagina gestuwd. Een klein deel van alle zaadcellen passeert de cervix. Bij het konijn (waar de ejaculatie ook in de vagina plaatsvindt) werd 2 uur na de coïtus 0,6% van de zaadcellen teruggevonden in de uterus, dit liep op tot 1,74% 12 uur na de coïtus (Chang,1956).

Zaadceltransport door de cervix vindt dus in drie stadia plaats:

1. een zeer snel transport van de allereerste zaadcellen
2. zaadceltransport naar de crypten in de cervicale mucosa
3. vrijkomen van zaadcellen uit de crypten, op weg naar de uterus (2 tot 3 dagen na de coïtus kunnen nog steeds levende zaadcellen in de cervicale mucus gevonden worden)

Zaadcellen in de uterus worden voornamelijk getransporteerd door contracties van de uterus. Het is waarschijnlijk dat prostagladinen verantwoordelijk zijn voor deze contracties. In het seminale plasma bevinden zich ook prostagladinen, maar deze zijn onvoldoende biologische actief om contracties van het myometrium te veroorzaken. Het is wel mogelijk dat zij de endogene prostaglandine-afgifte verhogen (Green,1979).

Zaadcellen die in de uterus geïnsemineerd worden, bezitten zelf niet het richtinggevoel om naar de utero-tubaire hoek te zwemmen, zij zwemmen willekeurig een bepaalde richting uit, de uteruscontracties geven de zaadcellen echter de juiste richting. Ook na het inbrengen van inerte partikels bleek dat deze door de contracties snel getransporteerd werden in de richting uterus-tubahoek (Wiqvist,1979).

Zaadcellen blijven bij de mens tot 24 uur na de coïtus aantoonbaar in de uterus. In de cervix kunnen dan nog steeds bewegende zaadcellen aangetoond worden. Het is mogelijk dat de verwijdering van zaadcellen door fagocyten in de uterus toeneemt na 24 uur (Moyer,1970). Bij de vleermuis kunnen zaadcellen gedurende maanden opgeslagen liggen in de crypten van de baarmoeder, voordat zij hun weg na de ovulatie naar het oviduct voortzetten (Austin,1960b).

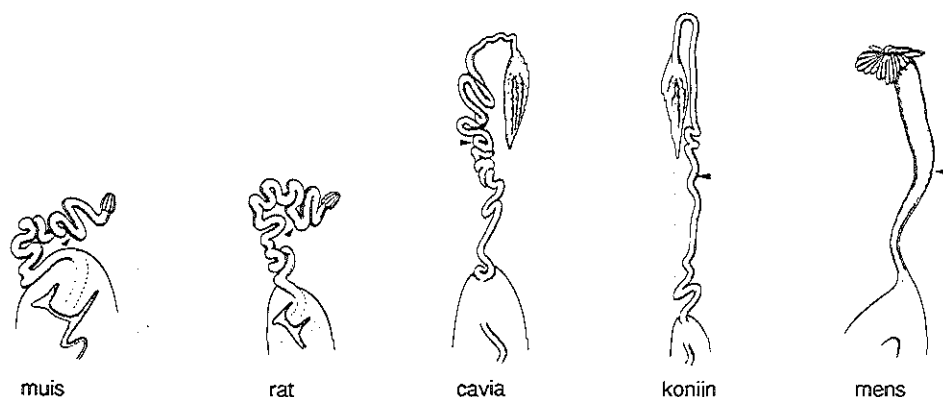
Na de uterus moeten de zaadcellen de uterus-tuba overgang passeren. Het aantal zaadcellen dat deze barrière passeert is bij de meeste diersoorten vergelijkbaar (zie Tabel 1.3)

Tabel 1.3: Vergelijking van de aantallen geëjaculeerde en migrerende zaadcellen bij verschillende zoogdieren (Harper,1982).

| Diersoort | # zaadcellen/ ejaculaat ($\times 10^6$) | Plaats van depositie | # zaadcellen in ampulla van de tuba |
|-----------|--|----------------------|--|
| muis | 50 | uterus | <100 |
| rat | 58 | uterus | 500 |
| konijn | 280 | vagina | 250-500 |
| cavia | 80 | vagina en uterus | 25-50 |
| runderen | 3000 | vagina | <10 |
| schaap | 1000 | vagina | 600-700 |
| varken | 8000 | uterus | 1000 |
| mens | 280 | vagina | 200 |

Er is geen anatomische sfincter op de overgang uterus-tuba die een barrière kan vormen. Bij de mens kunnen zelfs kleine partikeltjes deze overgang passeren (Woodruff,1969).

Bij het konijn is dit onmogelijk, alleen motiele zaadcellen kunnen de uterus-tuba overgang passeren en vloeistoftransport is alleen mogelijk tijdens passage van het embryo van het oviduct naar de uterus (Black,1959).



Figuur 1.5 Anatomie van uterus en oviduct bij verschillende zoogdieren, de pijl geeft de overgang tussen isthmus en ampulla aan (naar O. Nilsson en S. Reinus. Uit 'The mammalian oviduct'. Ed by E.S.E. Hafez en R.J. Blandau. University of Chicago Press, 1969)

Bij experimenten van Chang met het konijn, bleken inseminaties met minder dan ééntiende van het normale aantal zaadcellen, geen effect te hebben op het aantal zaadcellen dat de isthmus bereikt (Chang,1951b). Bij 0,5% van het normale aantal werd het aantal zaadcellen in de isthmus 60-voudig gereduceerd (5000 zaadcellen versus 90). Ook bij de mens is er een relatie gevonden tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en het aantal zaadcellen dat het oviduct bereikt (Settlage,1973b).

In het oviduct werden door Ahlgren en medewerkers bij vruchtbare vrouwen 2 tot 34 uur na de coïtus gemiddeld zo'n tweehonderd zaadcellen gevonden in de ampulla (Ahlgren,1973).

De passage van zaadcellen door de tuba gaat waarschijnlijk stapsgewijs. In de eerste fase is er een groep snelle zaadcellen, die enkele minuten na de inseminatie al in de ampulla aanwezig is. De meeste zaadcellen blijven na passage van de uterus-tuba overgang achter in de isthmus. Tot aan de ovulatie blijven ze hier en migreren dan pas verder (Harper,1973).

Indien de isthmus bij varkens chirurgisch verwijderd werd, werden veel grotere aantallen zaadcellen rond de geovuleerde eicel gevonden dan bij varkens met intacte oviducten (Hunter,1971). Ook nam het percentage eicellen met polyspermie toe na verwijdering van de isthmus. De isthmus kan zowel een barrière als een reservoir zijn voor zaadcellen.

Ook bij de mens is gevonden dat enige tijd na inseminatie er veel meer zaadcellen in de isthmus zijn dan in de ampulla (Croxatto,1975). Croxatto berekende dat er 5.000 tot 50.000 zaadcellen/ml in het oviduct aanwezig zijn. Een concentratie tien maal lager dan de minimum concentratie gewenst bij IVF.

Het is mogelijk dat zaadcellen pas na het verkrijgen van 'hyperactiviteit' zich een weg banen naar de ampulla. Voorafgaand aan de acrosoomreactie vertonen zaadcellen namelijk een korte tijd van verhoogde beweeglijkheid, hyperactivatie genoemd. In vitro uit deze beweeglijkheid zich niet in een grotere voorwaartse snelheid, maar in een grotere amplitude van de zaadcelkop en hogere staartslagfrequentie. In vivo leidt hyperactivatie wel tot een hogere snelheid (Suarez,1992).

Welke factoren deze plotselinge versnelling induceren is onbekend. Ca^{2+} en albumine spelen een rol bij het begin en bij het onderhouden van deze beweging maar zijn zeker niet alleen verantwoordelijk voor de hyperactivatie.

Hyperactivatie helpt de zaadcel bij passage van de isthmus tussen uterus en oviduct. Bij de muis liggen de meeste zaadcellen na aankomst in de isthmus gebonden aan het slijmvlies. Ten tijde van de ovulatie dissociëren een aantal zaadcellen van de wand en zwemmen richting ampulla. De losse zaadcellen vertonen veelal een hyperactief patroon van bewegen i.t.t. de aan de wand gebonden zaadcellen (Demott,1992). Hyperactivatie geeft zaadcellen ook de mogelijkheid sneller door de mucuslaag van het oviduct te dringen en door de cumulus oöphorus (Suarez,1992). Er bestaat ook een positieve relatie tussen hyperactivatie en penetratie van de zona (Flemming,1982).

Behalve door de eigen motiliteit migreren de zaadcellen volgens Harper ook door de vloeistofstroming in het oviduct en door contracties van de spierlaag richting eikel (Harper,1988). De cilia binnen het oviduct bewegen de door het oviduct geproduceerde vloeistof richting isthmus. Doordat de isthmus echter gesloten blijft stroomt de vloeistof terug door crypten in de oviductmucosa die minder cilia bevatten. Zo worden zaadcellen meegevoerd richting ampulla. Door contracties wordt de inhoud van het oviduct zodanig gemengd dat contact tussen eikel en zaadcel veel eerder mogelijk is, dan zaadcelmotiliteit alleen mogelijk zou maken.

Bij de meeste zoogdieren vindt de bevruchting in de ampulla van het oviduct plaats (Braden,1954). Veel onderzoek is verricht naar de aantallen zaadcellen in de ampulla rond het moment van de ovulatie. Resultaten van verschillende studies zijn door Harper verzameld (Harper,1982) (zie Tabel.1.3). Opvallend is het lage aantal zaadcellen dat in de ampulla gevonden werd in vergelijking tot de aantallen zaadcellen die gebruikt worden bij IVF.

Cummins en Yanagimachi bestudeerden behalve de aantallen zaadcellen ook het bevruchtingspercentage in vivo bij de goudhamster (Cummins,1982). Vier uur na inseminatie werden de eerste levende zaadcellen in de ampulla gevonden. Vijf uur na inseminatie werden de eerste eicellen met een zaadcel in de vitellus gevonden. Dit aantal liep op tot 91% eicellen met een gepenetreerde zaadcel 9 uur na de inseminatie. De verhouding zaadcel:eikel was de eerste uren in het voordeel van de eicellen. Pas zeven uur na inseminatie was de verhouding 1:1, 50% van de eicellen was dan bevrucht. Tien uur na inseminatie was er een maximum van 100 zaadcellen aanwezig in de ampulla. Dit aantal nam niet verder toe.

Het is bekend dat enkele minuten na de coïtus of na inseminatie al enkele zaadcellen in de ampulla aanwezig zijn. Dit is bij verschillende diersoorten gevonden, de hamster (Yanagimachi,1963a), cavia (Yanagimachi,1976), het konijn (Harper,1973). Het is echter onwaarschijnlijk dat dit de bevruchtende zaadcellen zijn (Cummins,1982). De eerste bevruchte eicellen zijn pas vijf uur na de inseminatie in de ampulla te vinden. De zaadcellen die als eerste in de ampulla waren, zijn dan al dood of verloren gegaan in de buikholte (Overstreet,1978). De bevruchtende zaadcellen worden in de isthmus achtergehouden tot de ovulatie volgt.

Een reden voor de overmaat van zaadcellen tien uur na inseminatie zou hulp bij de afbraak van de cumulus kunnen zijn. Een embryo zonder cumulus is beter in staat om de isthmus te passeren en kan zich eenvoudiger in de uterus innestelen (Cummins,1982).

Bij een bevruchting in-vitro moeten veel grotere aantallen zaadcellen gebruikt

worden om een hoog bevruchtingspercentage te behalen dan bij een bevruchting in-vivo. Als in-vitro dezelfde aantallen zaadcellen worden geïnsemineerd als in-vivo is het bevruchtingspercentage veel lager (Bavister,1979).

Stewart-Savage en Bavister hebben bevruchtingspercentages vergeleken in-vivo en in-vitro door de zgn. relatieve zaadcel:eicel verhouding te bestuderen (Stewart-Savage,1988). Hierbij wordt niet alleen de verhouding zaadcel:eicel bestudeerd maar ook de concentratie zaadcellen per ml. In-vivo is het volume in de ampulla waarin de bevruchting plaatsvindt namelijk veel kleiner dan in-vitro. Na omrekening van de zaadcelconcentratie t.o.v. het aantal eicellen is een vergelijking mogelijk. Rekening houdend met de concentratie zaadcellen en het volume waarin de bevruchting plaatsvindt zijn bij een in-vitro-fertilisatie evenveel zaadcellen nodig als bij een in-vivo-fertilisatie voor een succesvolle bevruchting (d.w.z. een bevruchtingspercentage van 90%) (Stewart-Savage,1988).

1.3.8 Capacitatie

De rijpe zaadcellen uit de epididymis die geëjaculeerd worden, zijn niet meteen in staat om een eicel te bevruchten. Zij moeten eerst een tijd in de vrouwelijke tractus genitalis doorbrengen. Ook bij een in-vitro bevruchting hebben zaadcellen enige tijd nodig voordat zij een eicel penetreren. Deze tijdsspanne wordt capacitatie genoemd en zij is voor het eerst ontdekt door Chang (Chang,1951a) en Austin (Austin,1951).

Capacitatie blijkt een voor zoogdieren uniek proces te zijn, het zou een evolutionaire aanpassing kunnen zijn voor het proces van inwendige bevruchting. De plaats van capacitatie is dan ook de tractus genitalis van het vrouwtjesdier in oestrus. De lokatie is veelal de plaats van ejaculatie of inseminatie van de zaadcellen. Bij species die zaadcellen in de vagina achterlaten vindt capacitatie plaats in de cervix, zoals bij de mens (Lambert,1985).

Indien de zaadcellen in de uterus worden geëjaculeerd zoals bij het konijn, dan begint de capacitatie in de uterus en wordt voltooid in het oviduct (Overstreet,1978). De belangrijkste plaats voor capacitatie is bij deze species het oviduct. De zaadcellen blijven na ejaculatie in de uterus eerst een tijd in rust achter in het isthmus deel van het oviduct voordat ze verder gaan naar de ampulla om de eicellen te bevruchten. Slechts een klein deel van de zaadcellen zal de isthmus verlaten om de eicellen te gaan bevruchten (Cummins,1986).

De capacitatietijd kan berekend worden door geëjaculeerde zaadcellen samen te brengen met geovuleerde eicellen en dan het bevruchtingspercentage te bekijken (in de eileiders of in-vitro). Pas geëjaculeerde zaadcellen kunnen maar weinig eicellen bevruchten, maar zaadcellen die enige tijd gepreïncubeerd zijn (in de vrouwelijke tractus genitalis of in-vitro) zullen na een zekere tijd alle eicellen kunnen bevruchten. Op deze manier zijn voor het konijn, de goudhamster en de muis minimale capacitatietijden gevonden van respectievelijk 5 uur, 2 uur en 1 uur (Austin,1985). Wat precies gebeurt tijdens de capacitatie is nog onbekend. Verondersteld wordt dat verscheidene factoren en substraten die tijdens de epididymis rijping en door het contact met de seminale vloeistof op de zaadcel zijn gaan hechten, verwijderd worden zodat zaadcel-receptoren vrijkomen die receptoren van de eicel herkennen (Austin,1985).

De veranderingen tijdens capacitatie zijn niet soortspecifiek, zaadcellen van een be-

paalde species kunnen namelijk capaciteren in de tractus genitalis van het vrouwtje van een andere species (DeMayo,1980).

Capacitatie in-vitro is ook mogelijk gezien de resultaten van de reageerbuisbevruchting, dit hoeft natuurlijk niet te betekenen dat capacitatie in-vivo en in-vitro op dezelfde wijze verlopen.

Capacitatie in-vitro werd voor het eerst aangetoond door Yanagimachi en Chang in 1963 (Yanagimachi,1963b). De in-vitro bevruchting van eicellen van de goudhamster door spermatozoa geïsoleerd uit de cauda epididymis, bewees dat de zaadcellen in-vitro capacitatie kunnen ondergaan. Yanagimachi en Chang maakten voor hun IVF-experimenten gebruik van een medium bestaande uit een door het oviduct geproduceerde vloeistof, follikelvloeistof en bloedserum. Toyoda kon echter met een medium bestaande uit louter anorganische chemicaliën in-vitro muize-oöcyten bevruchten met muize-zaadcellen afkomstig uit de cauda epididymis (Toyoda,1971).

Capacitatie is dus een moeilijk vast te stellen proces, het is wel duidelijk dat net geëjaculeerde zaadcellen uit de epididymis niet in staat zijn tot bevruchting zonder capacitatie. Maar als er geen bevruchting optreedt is niet te stellen dat dit komt door het uitblijven van de capacitatie. Evenmin is te stellen dat het optreden van de acrosoomreactie (een reactie die fysiologisch volgt op de capacitatie) een bewijs is voor het optreden van capacitatie.

In-vitro zijn zaadcellen uit de epididymis beter in staat tot bevruchting dan geëjaculeerde zaadcellen. Dit is het best te zien bij de kat, Niwa vond dat epididymale zaadcellen binnen 20 minuten in staat waren om een eikel te penetreren (Niwa,1985). Gewassen geëjaculeerde zaadcellen zijn pas in staat tot bevruchting na een 2 uur durende incubatie in de uterus (Hammer,1970).

Yanagimachi (Yanagimachi,1988) veronderstelt dat capacitatie een proces is waarbij én glycoproteïnen, die in de epididymis aan de plasmamembraan zijn gebonden, én glycoproteïnen en polypeptiden, die vanuit het seminale plasma aan de zaadcel binden, verwijderd worden. De glycoproteïnen afkomstig van de epididymis zijn eenvoudiger te verwijderen dan glycoproteïnen uit het seminale plasma. Daarom kunnen epididymale zaadcellen in een eenvoudig medium zoals dat gebruikt wordt bij een in-vitro-fertilisatie capaciteren. Geëjaculeerde zaadcellen capaciteren veel moeilijker. Om glycoproteïnen van de zaadcellen te verwijderen zou de vrouwelijke tractus genitalis nodig zijn.

Twee factoren die de capacitatie kunnen beïnvloeden zijn de fase van de cyclus waarin zich de vrouwelijke tractus genitalis zich bevindt en de samenstelling van het medium in-vitro. Ook de temperatuur speelt een rol. Een temperatuur van 37 à 38 C blijkt het meest optimaal te zijn voor de capacitatie (Flemming,1985).

De cumulus oöphorus lijkt geen rol te spelen bij de capacitatie. In-vitro kunnen eicellen zonder cumulus bevrucht worden door zaadcellen die in een eenvoudig medium gepreïncubeerd zijn (Ball,1983) en in-vivo is de secretie-vloeistof uit de vrouwelijke tr. genitalis voldoende voor de capacitatie (Yanagimachi,1988).

Er zijn geen organische of anorganische stoffen bekend die essentieel zijn bij de capacitatie. Bij iedere verbinding die uit een in vitro medium werd weggelaten trad toch capacitatie van zaadcellen op (Yanagimachi,1988).

1.3.9 Het acrosoom en de acrosoomreactie

Het acrosoom is een vacuole gelegen om de voorkant van de zaadcelkop en gevuld met hydrolytische enzymen. Het is analoog aan het lysosoom en aan de secretoire granulae van de pancreascel. Van alle enzymen binnen het acrosoom (zie tabel 1.4) zijn hyaluronidase en acrosine het best bestudeerd.

Tabel 1.4: Aangetoonde enzymen binnen het acrosoom (Yanagimachi, 1988)

| | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Hyaluronidase | β -N-Acetylhexosaminidase |
| | β -Galactosidase |
| Acrosine | β -Glucuronidase |
| Proacrosine | α -L-Fucosidase |
| Neuraminidase | Fosfolipase C |
| Fosfatase | Cathepsin D |
| Fosfolipase A | Peptidyl peptidase |
| | Ornithine decarboxylase |
| β -N-acetylglucosaminidase | |
| Arylsulfatase | |
| Arylamidase | |
| Collagenase | |

De buitenste acrosoommembraan ligt onder de plasmamembraan en vormt samen met de binnenste acrosoommembraan de wand van het acrosoom (zie figuur 2.3). De enzymen liggen zowel binnen het acrosoom of zijn gebonden aan de wanden.

Bij de acrosoomreactie komen de lytische enzymen door exocytose vrij uit het acrosoom en in een fysiologische situatie geschiedt deze reactie in de buurt van de zona. Algemeen wordt aangenomen dat hyaluronidase nodig zou zijn voor ontbinding van de matrix tussen de cellen van de cumulus oöphorus (deze matrix bestaat vnl. uit hyaluronzuur) en dat acrosine een rol speelt bij de penetratie van de zona pellucida, die bijna geheel bestaat uit glycoproteïnen (Yanagimachi, 1988).

Alhoewel deze beweringen nog bewezen moeten worden, is het wel zeker dat de acrosoomreactie twee functies heeft:

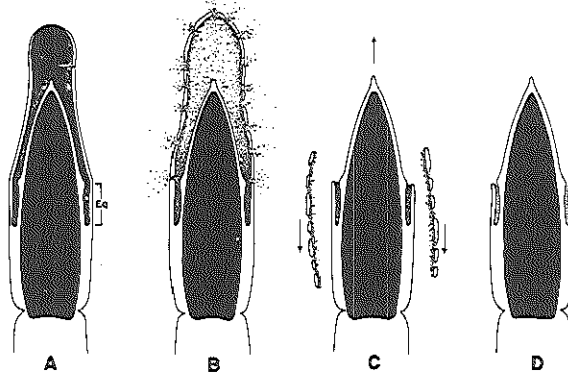
1. hulp voor de zaadcel bij passage van de zona pellucida.
2. voorbereiding van de zaadcel op de fusie met de plasmamembraan van de eicel (Yanagimachi, 1988)

Bij het bestuderen van de acrosoomreactie moet een onderscheid gemaakt worden tussen een echte en een schijnbare acrosoomreactie (Bedford, 1970). Bij een schijnbare acrosoomreactie zoals die plaatsvindt bij dode zaadcellen worden de buitenste acrosomale membraan en de plasmamembraan spontaan gelyseerd door de acrosomale enzymen (autodigestie).

De bestudering van de acrosoomreactie wordt verder bemoeilijkt door het feit dat lichtmicroscopie alleen bij zaadcellen met een relatief groot acrosoom, zoals bij de cavia en de goudhamster, duidelijk een verandering laat zien. Bij zaadcellen met een klein acrosoom zoals die van de muis en de mens moeten andere technieken gebruikt

worden. De 'triple-stain'-techniek of gebruik van monoclonale antilichamen om een reactie aan te tonen zijn hierbij toegepast (Rijnders,1988).

Barros was de eerste die de verschillende stappen in de acrosoomreactie heeft gezien. Op diverse plaatsen ontstaat een fusie tussen de buitenste acrosomale membraan en de bovenliggende plasmamembraan, waarna de inhoud van het acrosoom door de ontstane poriën kan ontsnappen (Barros,1967).



Figuur 1.6 De acrosoomreactie. A. De zaadcelkop voor de acrosoomreactie. B. Meerdere stukjes van de plasmamembraan en de buitenste acrosomale membraan fuseren, enzymen ontsnappen uit het acrosoom. C, D. acrosoomreactie is voltooid, stukjes van de gefuseerde membranen worden achtergelaten als de zaadcel voorwaarts beweegt. (naar R. Yanagimachi: Mechanisms of fertilization in mammals. Uit 'Fertilization and embryonic development in vitro', Ed by L. Mastroianni en J.D. Biggers. Plenum Press, New York, 1981)

Bij de mens begint de acrosoomreactie mogelijk in het achterste deel van het acrosoom in de buurt van het equatoriaal gebied en schrijdt dan naar voren voort, totdat de gehele plasmamembraan met de buitenste acrosomale membraan heeft gereageerd. De acrosomale inhoud kan dan in zijn geheel vrijkomen en de binnenste acrosomale membraan vormt vanaf dat moment de buitenzijde van de zaadcelkop (Yanagimachi,1988).

1.3.10 Inductie van de acrosoomreactie

Als de zaadcellen de capacitatie ondergaan hebben, kan de acrosoomreactie vrij snel plaatsvinden, de reactie duurt ook niet lang mits de omstandigheden ideaal zijn en de juiste stimuli aanwezig zijn.

De acrosoomreactie vindt plaats in de nabijheid van de eicel. Bij verschillende zoogdieren is de acrosoomreactie bestudeerd na een inseminatie in-vivo. Zaadcellen uit de ampulla van het oviduct bleken geen van allen een acrosoomreactie ondergaan te hebben. De zaadcellen die tussen de cumuluscellen rondzwommen, hadden voor een deel de acrosoomreactie ondergaan en de zaadcellen die contact hadden gehad met de zona pellucida, hadden bijna alle gereageerd (Austin,1958; Suarez,1983 en Yanagimachi,1984).

Het is mogelijk dat de cumuluscellen de eerste aanzet geven tot de natuurlijke acrosoomreactie (Cherr,1986), maar de acrosoomreactie kan ook in-vitro gemakkelijk optreden zonder aanwezigheid van cumuluscellen.

Wassarman heeft een model opgesteld voor de inductie van de acrosoomreactie bij de muis (Wassarman,1989). Het ZP3 bindt via species-specifieke O-gebonden oligosacchariden aan de receptor op de zaadcel. De polypeptideketen van het ZP3 induceert daarop de acrosoomreactie (zie ook paragraaf 1.2.5 en paragraaf 1.4.2.1).

Behalve structuren als de zona pellucida, de cumulus oöphorus en delen van de vrouwelijke tr. genitalis zijn er veel stoffen bekend die de acrosoomreactie kunnen induceren. Iedere stof of factor die de permeabiliteit van de plasmamembraan van de zaadcel voor een bepaald ion, b.v. Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , kan vergroten, kan een acrosoomreactie induceren (Yanagimachi,1988).

1.3.11 Modellen voor de acrosoomreactie

De belangrijkste fysiologische gebeurtenis bij de acrosoomreactie is de influx van Ca^{2+} . Ca^{2+} -influx alleen is echter niet voldoende voor een acrosoomreactie. Door Yanagimachi wordt het volgende model voor de acrosoomreactie voorgesteld.

Normaal worden de ionverhoudingen binnen en buiten de zaadcel geregeld door een Na^+ , K^+ -ATPase en een Ca^{2+} -ATPase. Door capacitatie verandert de lipidelaag van de plasmamembraan waardoor receptoren voor zona-eiwitten vrij komen te liggen. Deze receptoren kunnen Ca^{2+} -dragende eiwitten zijn en bij activatie vergemakkelijken zij de influx van Ca^{2+} . Dit veroorzaakt inactivatie van het Na^+ , K^+ -ATPase en het intracellulair Na^+ stijgt. Na^+ wordt uitgewisseld tegen H^+ , waardoor de intracellulaire pH stijgt. Het Ca^{2+} veroorzaakt bindingen tussen fosfolipiden in de plasmamembraan en de buitenste acrosoommembraan, waardoor een fusie tussen deze twee membranen ontstaat en poriën worden gevormd.

Een hoog intracellulair Ca^{2+} en laag H^+ veroorzaakt de conversie van proacrosine in acrosine en dit veroorzaakt de ontbinding van de acrosomale matrix (Yanagimachi, 1988).

Een spontane acrosoomreactie kan dan optreden door een activatie van de zona-receptoren op de plasmamembraan of door inactivatie van de Ca^{2+} -pomp, waardoor Ca^{2+} in de cel lekt.

1.4 DE BEVRUCHTING

1.4.1 Passage van de cumulus oöphorus

Zaadcellen blijken zowel in-vivo als in-vitro makkelijk de laag cumuluscellen te kunnen passeren. Of alle zaadcellen zo eenvoudig door de cumuluslaag kunnen gaan is nog onbekend. Austin bewees dat zaadcellen van de muis eerst gecapaciteerd moeten zijn, voordat ze de cumuluslaag kunnen binnendringen. Door uitblijven van de capacitatie blijven ze op de rand van de cumulus achter (Austin,1960a).

Cummins bewees dat dit ook geldt voor zaadcellen van de hamster. Zaadcellen die reeds een acrosomale reactie ondergaan hadden, waren niet in staat de cumulus te

passeren, zij blijven aan de buitenrand van de cumulus kleven (Cummins,1986). Dit zou betekenen dat de zaadcel geen hyaluronidase nodig zou hebben om de cumulus-matrix op te lossen. Toch is het niet uit te sluiten dat passage van de cumulus bevordert wordt door afgifte van hyaluronidase uit het acrosoom of door andere enzymen, die de structuur van de cumulus losser maken (Yanagimachi,1988).

1.4.2 De zona pellucida

1.4.2.1 Binding aan de zona pellucida

In-vivo kost de zonapassage veel minder tijd dan in-vitro. Bij de hamster vond Yang dat het maar 7 minuten duurde voordat een zaadcel in-vivo de zona gepasseerd had (Yang,1972) en voor de in-vitro situatie vond Yanagimachi een tijd van 3 tot 4 uur (Yanagimachi,1970). Deze tijd is natuurlijk afhankelijk van het al dan niet gecapaciteerd zijn van de zaadcellen, maar het belangrijkste bleek toch de samenstelling van het externe milieu te zijn waarin eicel en zaadcel zich bevinden. Dit milieu kan in-vivo veel gunstiger zijn voor een acrosoomreactie dan in-vitro.

Nadat de zaadcellen de zona pellucida bereikt hebben zullen ze eerst aan de zona hechten. Door op dat moment de eicel te spoelen met een micropipet zijn de zaadcellen nog gemakkelijk van de zona te verwijderen. Kort daarna binden de zaadcellen zich aan de zona, waarna dissociatie van de gameten niet gemakkelijk meer kan plaatsvinden (Wassarman,1989).

De eerste aanwijzing voor de aanwezigheid van receptormoleculen op de zona pellucida werd gevonden door Gwatkin en Williams (Gwatkin,1977). Opgeloste zonae pellucidae van rijpe eicellen waren in staat om gecapaciteerde zaadcellen te hinderen bij hun binding aan de zonae van onbevuchte eicellen.

Voor binding van een zaadcel aan de zona zijn receptoren nodig op de zona die de zaadcel herkennen, en receptoren op de zaadcel die de zona herkennen. De zaadcelreceptoren op de zona bestaan uit glycoproteïnen.

Door Wassarman zijn in de muizezona drie glycoproteïnen gevonden (zie ook paragraaf 1.2.5). Behalve de structuur werd ook de functie van deze glycoproteïnen door Wassarman opgehelderd (Wassarman,1992). De eerst hechting van de zaadcel aan de zona geschiedt door de herkenning van een bindingseiwit op de plasmamembraan van de zaadcel voor het ZP3. De binding van zaadcellen door ZP3 geschiedt door de O-gebonden oligosacchariden van ZP3.

Een proteïne op de plasmamembraan van de zaadcel, het zgn. sp56, bezit een grote affiniteit voor ZP3. Het sp56 is alleen gelokaliseerd op de plasmamembraan boven het acrosoom. Wassarman postuleert dat dit het receptoreiwit op de plasmamembraan is.

Het ZP3 induceert de acrosoomreactie en de zaadcel laat daarna de zona voor korte tijd los. Daarna hecht ZP2 aan een tweede bindingseiwit gelegen op de binnenste acrosomale membraan van de zaadcel. Mogelijk is dit tweede bindingseiwit het proacrosine (Jones,1988).

Wassarman stelt dat de O-gebonden oligosacchariden op het ZP3 verantwoordelijk zijn voor de species-specifieke binding van zaadcellen aan de zona (Wassarman,1992). Binding van zaadcellen aan de zona geschiedt door oligosacchariden die groepen

bezitten als N-acetyl-D-glucosamine, sialzuur, fucose of galactose. Mogelijkheden hiervoor zijn de binding van galactosyltransferase op de zaadcel aan het N-acetyl-D-glucosamine van de zona (Lopez,1985) of sialyltransferase van de zaadcel aan het sialzuur van de zona (Durr,1977).

Kunnen bij de muis alleen zaadcellen met intact acrosoom aan de zona binden, bij de goudhamster kunnen zaadcellen zowel voor als na de acrosoomreactie aan de zona binden (Suarez,1984). Bij de cavia hechten alleen zaadcellen zonder acrosoom aan de zona (Huang,1981).

1.4.2.2 Penetratie van de zona

Na de binding penetreert de zaadcel de zona, de zaadcel heeft zijn acrosoom verloren (behalve het equatoriale deel) en maakt met zijn binnenste acrosomale membraan direct contact met de zona. De staart van de zaadcel beweegt zeer heftig tijdens de zonapenetratie, zodat de zaadcelkop mechanisch met zijdelingse en voor-achterwaartse bewegingen de zona passeert (Yanagimachi,1966). Zaadcellen van de meeste species nemen een schuine weg door de zona (Austin,1958), maar een rechte route, loodrecht op het oppervlak van de zona is ook mogelijk (Gaddum-Rose,1985).

Bij vogels en buideldieren maken enzymen uit het acrosoom een gat in de smalle zona (1-2 μm) waar de zaadcel door naar binnen kan zwemmen (Rodger,1982). Bij placentaire zoogdieren is de zona veel dikker, en kan passage van de zona niet alleen door enzymatische werking verklaart worden. Yanagimachi beschrijft twee mogelijkheden voor passage (Yanagimachi,1988).

1. Passage d.m.v. mechanische kracht: de acrosoomreactie is uitsluitend bedoeld om de smalle, spitse kop van de zaadcel, het perforatorium, vrij te leggen. Deze kop snijdt door de zona, aangedreven door de zaadcelstaart.

2. Passage d.m.v. enzymatische oplossing van de zona: hyaluronidase uit het acrosoom verzorgt een eenvoudige weg door de cumulus, nog onbekende enzymen helpen de zaadcel bij zijn receptorbinding aan de zona. Daarna hydrolyseert acrosine glycoproteïnen in de zona om de zona te 'verweken'. De enzymen, die gebonden zijn aan de binnenste acrosomale membraan splitsen de glycoproteïnen. Bewegingen van de staart stuwden de zaadcel vooruit en brengen de enzymen uit het acrosoom steeds opnieuw in contact met de te splitsen moleculen van de zona.

Er zijn argumenten die tegen beide hypothesen pleiten. Bij de eerste, de mechanische hypothese, heeft het acrosoom dat gevuld is met krachtige enzymen totaal geen functie. Als het acrosoom een rudiment zou zijn, zouden er wel species bestaan bij wie het acrosoom veel groter of kleiner zou zijn dan bij de huidige hoogst ontwikkelde dieren.

Tegen de tweede, de enzymatische hypothese, pleit dat de zona veel te dik is om door enzymen uit het acrosoom opgelost te kunnen worden. Bij vogels en buideldieren ligt dit anders daar hier de zona veel dunner is (Rodger,1982).

Beide hypothesen zijn wellicht te combineren: acrosomale enzymen zijn nodig voor het week maken van de zona. Als er veel enzymen voor nodig zijn, is het beter dat de acrosoomreactie vlak bij of op de zona plaatsvindt, zoals bij de muis en de hamster. Als grote hoeveelheden enzym niet nodig zijn, kan de acrosoomreactie ook al eerder plaatsvinden, zoals bij de cavia en het konijn (Kusan,1984). De enzymen breken de bin-

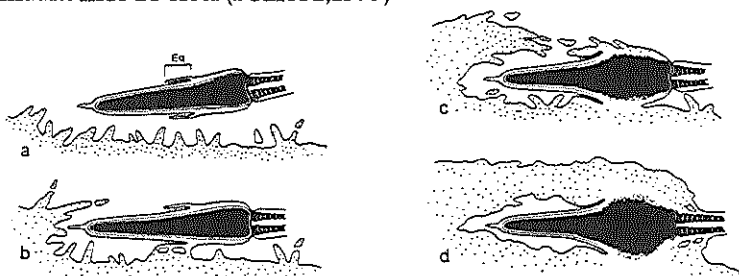
dingen in de zona-eiwitten open, waarna de voortgestuwde kop deze bindingen uiteen kan duwen.

1.4.3 Oölemma

Na passage van de zona komt de zaadcel in de perivitelline ruimte terecht en zal zich hechten aan de plasmamembraan van de eicel.

Bij vogels en amfibieën maakt de binnenste acrosoommembraan contact met de eicel, bij zoogdieren gaat dit anders. Bij zoogdieren maakt de plasmamembraan van de zaadcelkop als eerste contact met de eicelmembraan.

Piko en Tyler hebben dit voor het eerst gezien (Piko,1964). Later bleek dat het deel van de plasmamembraan dat zich boven het equatoriale segment bevindt als eerste contact maakt met de eicel (Bedford,1979)



Figuur 1.7 Contact van de zaadcel met de eicelmembraan. A t/m D. De zaadcel, die de acrosoomreactie ondergaan heeft, nadert het oölemma. De zaadcel maakt met zijn equatoriale (Eq) segment het eerste contact met het oölemma. Daarna versmelt de zaadcelkop met de eicel. (naar J.M. Bedford, H.I. Calvin en G.W. Cooper. Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. Uit 'Membrane surface reviews (membrane fusion). Vol 5. Ed by G. Poste en G.L. Nicolson. Elsevier Scientific. (Amsterdam, 1973.)

Alleen zaadcellen die de acrosoomreactie ondergaan hebben, kunnen contact maken met de eicel. Op de plasmamembraan van het equatoriale deel moet dus ook een belangrijke verandering plaatsvinden tijdens de acrosoomreactie. Wat deze verandering inhoudt is echter nog niet bekend (Yanagimachi,1988).

De eicel bezit, behalve op het gebied boven de metafasespoel van de tweede meiotische deling, vele microvilli. Het zijn deze microvilli die als eerste contact maken met de zaadcel.

De zaadcel- en eicelplasmamembraan vloeien samen, zodat de moleculen van de zaadcelplasmamembraan zich over de gehele eicel verdelen. Experimenten van Gaunt wezen uit dat antilichamen gericht tegen de zaadcelplasmamembraan niet aantoonbaar zijn op een onbevuchte eicel, maar wel op een bevruchte eicel. Het antilichaam had zich bij de bevruchte eicellen gelijkmatig over de gehele plasmamembraan van de eicel verdeeld (Gaunt,1983). Opvallend was dat op tweecellige embryo's dit antilichaam niet meer aantoonbaar was. Koyama kon de anti-plasmamembraan antilichamen wel aantonen bij tweecellige ratte-embryo's (Koyama,1984).

Primakoff en medewerkers vonden op de zaadcelkop bij de cavia een eiwit, PH-30, dat een rol kan spelen bij de interactie van de zaadcel- en eicelplasmamembraan (Primakoff, 1987). Dit eiwit is gelokaliseerd posterior van het acrosoom op de zaadcelkop en bestaat uit een α - en een β -deel. Het α -deel bestaat uit een peptidekern van 289 aminozuren. De structuur van dit deel lijkt veel op de fusie-eiwitten van virussen. Het β -deel bestaat uit een keten van 353 aminozuren. Dit deel lijkt veel op een zgn. disintegrine, een bloedplaatjesaggregator die veel gevonden wordt in slangegif. Deze disintegrinen binden aan integrinen. Er zijn sterke aanwijzingen dat op de eicelmembraan integrinen aanwezig zijn. Dit maakt het mogelijk dat PH-30 zowel een functie kan uitoefenen bij de binding van zaadcel en eicel als ook de fusie tussen de membranen mogelijk kan maken (Blobel, 1992).

1.4.4 Eicelactivatie

Na de fusie van zaadcel en eicel 'ontwaakt' de eicel. Dit noemt men activatie. De belangrijkste veranderingen zijn een exocytose van corticale granulae en het voltooiën van de tweede meiotische deling. De metafase II spoel van de secundaire oöcyt scheidt het gesplitste chromatine, waardoor de helft van het chromatine in het tweede poollichaampje terecht komt.

Deze veranderingen worden gevolgd door decondensatie van de zaadcelkern. Daarna volgt DNA-synthese (chromosoomduplicatie) van de mannelijke en vrouwelijke chromosomen. De mannelijke en vrouwelijke pronuclei komen in het centrum van de eicel tegen elkaar te liggen, hun membranen desintegreren en de chromosomen vermengen zich voor de eerste mitotische deling (Yanagimachi, 1988).

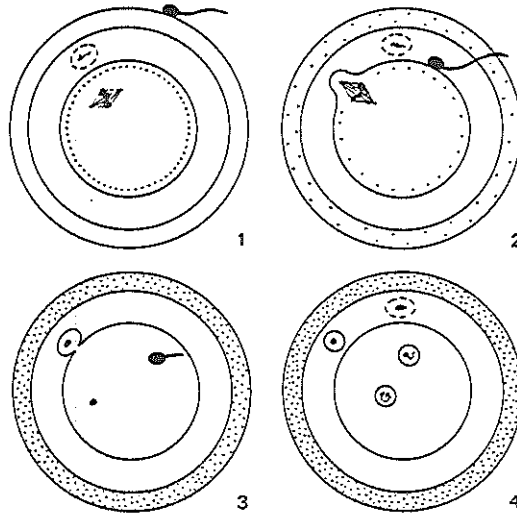
De fysiologie van de eicelactivatie is nog niet geheel opgehelderd. Vermoedelijk veroorzaakt de zaadcel-eicelfusie het vrijkomen van intracellulair Ca^{2+} (voornamelijk uit het endoplasmatisch reticulum). Dit begint op de plaats van de eicel-zaadcelfusie (Miyazaki, 1986). Bij de zeeëgel veroorzaakt deze intracellulaire Ca^{2+} -stijging een Na^+/H^+ uitwisseling over de eicelmembraan, de intracellulaire pH stijgt, waardoor oxidatieve fosforylering, het lipidemetabolisme en de eiwit- en DNA-synthese geactiveerd worden (Whitaker, 1985). Bij de muis stijgt de concentratie ADP, waardoor het cellulaire metabolisme en de oxidatieve fosforylering toenemen (Leese, 1984).

Er zijn behalve zaadcellen nog vele niet-fysiologische stimuli die de eicel kunnen activeren. Eicellen van enkele insecten, vissen en hagedissen kunnen op deze manier geactiveerd worden. Ook zonder tussenkomst van een zaadcel kunnen de eicellen zich ontwikkelen tot embryo's en in sommige gevallen bij vissen en reptielen tot levende organismen: parthenogenese (Marle, 1983; Mittwoch, 1978). Directe injectie van Ca^{2+} in het eicelcytoplasma leidt ook tot activatie. Het is mogelijk dat de zaadcel Ca^{2+} in de eicel brengt, wat tot een algehele Ca^{2+} -afgifte aanleiding geeft (Yanagimachi, 1988).

1.4.5 Zona-reactie

Na het contact van de eicel- en zaadcelmembraan ontstaat een golf van Ca^{2+} -afgifte gevolgd door de exocytose van de corticale granulae (Austin, 1956; Schuel, 1985). Deze granulae zijn kleine blaasjes gebonden aan de plasmamembraan van een rijpe, onbevuchte eicel (zie figuur 1.8).

GAMETEN EN DE BEVRUCHTING



Figuur 1.8 Schema van de bevruchting en tweede meiotische deling. 1. De zaadcel maakt contact met de zona pellucida, het eerste poollichaampje bevindt zich in de perivitelline ruimte. 2. De zaadcelkop maakt contact met het oölemma, de corticale granulae komen vrij, de meiotische spoel van de eicel ligt onder het oölemma. 3. De zaadcelkop bevindt zich in het cytoplasma van de eicel, de zona-reactie is voltooid, het tweede poollichaampje snoert zich af. 4. Mannelijke en vrouwelijke pronucleus zijn gevormd, het tweede poollichaampje bevindt zich in de perivitelline ruimte.

De corticale granulae bevatten hydrolytische enzymen en sacchariden. In sommige species veranderen deze componenten na het vrijkomen in de perivitelline ruimte de fysische en chemische eigenschappen van de zona pellucida. Op deze wijze wordt de zona ondoordringbaar voor zaadcellen. Dit noemt men de zona-reactie. De functie is zeer duidelijk: het verhinderen van polyspermie.

Wassarman beweert dat bij de muis de zona-reactie bestaat uit een modificatie van de O-gebonden oligosacchariden van het ZP3. Hierdoor kunnen zaadcellen zich niet meer aan de zona binden en wordt de acrosoom-reactie inducerende werking van de zona duidelijk minder (Wasserman, 1987).

Behalve op de zona bestaat ook op de eicelmembraan een polyspermieblokkade. Over deze blokkade is maar weinig bekend. De eicellen van hamster, hond, schaap en veldmuis en waarschijnlijk ook de mens, vertonen na bevruchting een sterke zonareactie. Er worden bij deze species bijna nooit zaadcellen binnen de zona pellucida aangetoond na bevruchting. Bij de eicellen van het konijn en de mol worden veel zaadcellen binnen de zona gezien terwijl slechts één zaadcel de eicel binnen gedrongen is. Hier ligt de belangrijkste blokkade op het niveau van de eicelmembraan (Yanagimachi, 1988).

Dat bijvoorbeeld bij de mens toch polyspermie voorkomt, is mogelijk te wijten aan een vertraagde corticale reactie. Bij onrijpe eicellen of bij 'overrijpe', te oude eicellen is het bij een in vitro bevruchting mogelijk dat al meerdere zaadcellen de zona gepasseerd zijn voordat de corticale reactie voltooid is. De blokkade van de eicelmem-

braan is nu onvoldoende werkzaam (Sathananthan,1985).

Hoewel de meeste corticale granulae pas bij de eicel-zaadcelfusie vrijkomen, worden vooraf ook al enkele granulae afgestoten. Dit kan een rol spelen bij de vorming van de perivitelline ruimte. Als deze ruimte niet aanwezig zou zijn, zou het voor een zaadcel veel moeilijker zijn om, na passage van de zona, met het equatoriale deel contact te maken met de eicelmembraan. De zona wordt door deze premature corticale reactie moeilijker penetreerbaar voor zaadcellen, waardoor alleen de best beweeglijke, hardst schuddende zaadcellen uitverkoren zouden zijn voor een bevruchting (Yanagimachi,1988).

1.4.6 Zaadceldecondensatie

De zaadcelnucleus is sterk gecondenseerd als de spermatogenese voltooid is. Het chromatine wordt compact gemaakt door de aanwezigheid van 'zaadcel-specifieke' histonen (of protaminen) die rijk zijn aan basische aminozuren zoals arginine, serine en cysteine. In de epididymis vindt een verdere verdichting plaats door het ontstaan van veel SS-bruggen tussen de protaminen in de kern. Dit geeft de zaadcel een elastische hardheid, welke bescherming biedt bij de passage van de zona.

In het eicelcytoplasma desintegreert de membraan van de nucleus en komt het chromatine van de zaadcel direct in contact met het eicelcytoplasma (Longo,1985). De protaminen gaan verloren en de SS-bruggen worden verbroken. Welke factoren hiervoor verantwoordelijk zijn is nog onbekend (Yanagimachi,1988). De gedecondenseerde zaadcelkern en de overgebleven chromosomen van de eicel transformeren zich tot mannelijke en vrouwelijke pronucleus. Tijdens de pronucleusvorming treedt een actieve DNA-synthese op (Naish,1987).

In het cytoplasma van de eicel bevindt zich waarschijnlijk een zaadcel-pronucleus-groefactor. Er is een beperkte hoeveelheid van deze groefactor aanwezig, want één eicel is maar in staat om enkele van de gepenetreerde en gedecondenseerde zaadcellen om te zetten in pronuclei (Hirao,1979). Deze groefactor is niet species specifiek, want een hamstereicel is in staat om een gepenetreerde menselijke zaadcel om te zetten in een pronucleus.

1.4.7 Voltooing van de tweede meiotische deling

De meiotische spoel van de eicel ligt bij de uiteindelijke voltooiing van de tweede meiotische deling tegen de eicelmembraan (zie figuur 1.8). Na eicelactivatie wordt het tweede poollichaampje afgesnoerd en worden de resterende chromosomen omgeven door microfilamenten. Ook de binnengedrongen zaadcelkop wordt omgeven door microfilamenten.

Door microtubuli worden de beide pronuclei naar het centrum van de eicel getrokken. Bij de desintegratie van de pronucleusmembraan rangschikken de microtubuli zich als centromeren om de chromosomen. De chromosomen ondergaan daarna de eerste mitotische deling (Schatten,1986).

Vanaf dit moment begint de embryogenese.

1.5 REFERENTIES

Ahlgren M, Boström K, Malmqvist R. Spermtransport and survival in women with special reference to the Fallopian tube. In: Hafez ESE, Thibault CG (eds). The biology of spermatozoa. Karger, Basel; 1973: 63-73.

Ahuja KK, Bolwell CP. Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida. J Reprod Fertil 1983; 69: 49-55.

Amelar RD, Hotchkiss RS. The split ejaculate. Fertil Steril 1965; 16: 46.

Amir D, Ortavant R. Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal epididymaire du belier. Ann Biol Biochim Biophys 1968; 8: 195-207.

Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res 1951; 4: 581-596.

Austin CR, Braden AWH. Early reaction of the rodent egg to spermatozoa penetration. J Exp Biol 1956; 33: 358-365.

Austin CR, Bishop MWH. Role of the rodent acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. Proc R Soc Lond (Biol) 1958; 149: 241-248.

Austin CR. Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. J Reprod Fertil 1960a; 3: 310-311.

Austin CR. Fate of spermatozoa in the female genital tract. J Reprod Fertil 1960b; 1: 151-156.

Austin CR. Sperm maturation in the male and female genital tracts. In: Metz CB, Monroy A (eds). Biology of fertilization. Vol 2. Academic Press, New York, 1985; 121-155.

Baker TG. Oogenesis and ovulation. In: Austin CR, Short RV (eds). Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization. Cambridge University Press, Cambridge, 1982; 17-45.

Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. Biol Reprod 1983; 28: 717-725.

Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. J Cell Biol 1967; 34: C1-C5.

Bavister BD. Fertilization of hamster eggs in vitro at sperm:egg ratios close to unity. J Exp Zool 1979; 210: 259-264.

Bedford JM. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol Reprod (Suppl) 1970; 2: 128-158.

Bedford JM. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Hamilton DW, Greep RO. Handbook of physiology. Section 7: Endocrinology, vol 5. Male reproductive system. American physiological society, Washington DC, 1975; 303-317.

HOOFDSTUK 1

Bedford JM. Influence of abdominal temperature on epididymal function in the rat and rabbit. *Am J Anat* 1978; 152: 509-522.

Bedford JM, Moore HDM, Franklin LE. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoa in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 1979; 119: 119-126.

Bedford JM, Rodger JC, Breed WG. Why so many spermatozoa, a clue from marsupials. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1984; 221: 221-233.

Black DL, Asdell SA. Mechanism controlling entry of ova into rabbit uterus. *Am J Physiol* 1959; 197: 1275-1278.

Bleau G, St-Jacques S. Transfer of oviductal proteins to the zona pellucida. In: Dietl J (ed). *The mammalian egg coat. Structure and function.* Springer Verlag, Berlin, 1989; 99-110.

Bleil JD, Wassarman PM. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980a; 76: 185-202.

Bleil JD, Wassarman PM. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980b; 77: 1029-1033.

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992; 356: 248-252.

Block E. Quantitative morphological observations of the follicular system in women. Variation at different ages. *Acta Anat* 1952; 14: 108.

Braden AWH, Austin CR. The number of sperms about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. *Aust J Biol Sci* 1954; 7: 543-551.

Brandriff BF, Gordon LA, Haendel S, Ashworth LK, Carrano AV. The chromosomal constitution of human sperm selected for motility. *Fertil Steril* 1986; 46: 686-690.

Byskov AG. Primordial germ cells and regulation of meiosis. In: Austin CR, Short RV (eds). *Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization.* Cambridge University Press, Cambridge, 1982; 1-16.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature* 1951a; 168: 997-998.

Chang MC. Fertilization in relation to the number of spermatozoa in the Fallopian tubes of rabbits. *Ann Obstet Gynecol* 1951b; 73: 918-925.

Chang MC. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J Exp Zool* 1955; 128: 378-405.

Chang MC. Reaction of the uterus on spermatozoa in the rabbit. *Ann Obstet Gynecol* 1956; 78: 74-86.

Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zonae pellucidae. *Dev Biol* 1986; 114: 119-131.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198-235.

Cohen J. Correlation between sperm 'redundancy' and chiasma frequency. *Nature* 1967; 215: 862-863.

Cooper GW, Overstreet JW, Katz DF. The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. *Gamete Res* 1979; 2: 35-42.

Croxatto HB, Faunders A, Medel M, Avendaño S, Croxatto HD, Vera C, Anselmo J, Pastene L. Studies on sperm migration in the human female tract. In: Hafez ESE, Thibault CG (eds). *The biology of spermatozoa*. Karger, Basel, 1975; 52-62.

Cummins JM, Yanagimachi R. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5: 239-256.

Cummins JM, Yanagimachi R. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to timing of the acrosome reaction. *Gamete Res* 1986; 15: 187-212.

D'Addario DA, Turner TT, Howarda SS. Effect of vasectomy on the osmolality of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. *J Androl* 1980; 1: 167-170.

DeMayo FJ, Mizoguchi H, Dukelow WR. Fertilization of squirrel monkey and hamster ova in the rabbit oviduct. *Science* 1980; 208: 1468-1469.

Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 1992; 46: 779-785.

Dietl J. Ultrastructural aspects of the developing mammalian zona pellucida. In: Dietl J (ed). *The mammalian egg coat, structure and function*. Springer-Verlag, Berlin, 1989; 49-60.

Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986; 44: 831-838.

Dunbar BS, Liu C, Sammons DW. Identification of three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by two-dimensional gel electrophoresis: comparison of with follicular fluid, sera and ovarian cell proteins. *Biol Reprod* 1981; 24: 1111-1124.

Durr R, Shur B, Roth S. Sperm-associated sialyltransferase activity. *Nature* 1977; 265: 547-548.

Eddy EM, Clark JM, Gong D, Fenderson. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Res* 1981; 4: 333-362.

Eddy EM. The spermatozoa. In: Knobil E, Neill J (eds). *The physiology of reproduction*.

HOOFDSTUK 1

Raven Press, New York, 1988; 27-68.

Eliasson R. Studies on prostagladin. Occurence and formation and biological action. *Acta Phys Scan* 1959; 46 (Suppl 158): 1-73.

Elstein M, Moghissi KS, Borth R. Cervical mucus in human reproduction. Scriptor, Copenhagen, 1971.

Eppig J. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J Exp Zool* 1979; 209: 345-353.

Eppig J. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 1982; 89: 268-272.

Eppig J. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. In: Browder L (ed). *Developmental Biology: a comprehensive synthesis*. Vol 1, Oogenesis. Plenum Press, New York, 1985; 313-347.

Flemming AD, Yanagimachi R. Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1982; 220: 109-115.

Flemming AD, Kuehl TJ. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1985; 233: 405-411.

Fox CA, Wolff HS, Baker JA. Measurement of intra-vaginal and intra-uterine pressures during human coitus by radio-telemetry. *J Reprod Fertil* 1970; 22: 243-251.

Fox CA, Fox B. A comparative study of coital physiology with special reference to the sexual climax. *J Reprod Fertil* 1971; 24: 319-336.

Franchii LL. The ovary: development, structure and temporal changes. In: Philipp EE, Barnes J, Newton M (eds). *Scientific foundations of obstetrics and gynaecology*. William Heinemann Medical Books, London, 1977.

French-Constant C, Hollingworth A, Heasman J, Wylie CC. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development* 1991; 113: 1365-1373.

Gaddum-Rose P. Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs?. *Am J Anat* 1985; 173: 347-356.

Gardner RL, Lyon MF, Evans EP, Burtenshaw MD. Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 88: 349-363.

Gaunt SJ. Spreading of the sperm surface antigen within the plasma membrane of the egg after fertilization in the rat. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 75: 257-270.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gas-

trulation. Development 1990; 110: 521-528.

Gougeon A. Le follicule ovulatoire humain. A quel moment du cycle est-il sélectionné et par quels mécanismes? Une tentative de réponse. Contraception-Fertilité-Sexualité 1984; 12: 1397-1405.

Green SH, Zuckerman S. Quantitative aspects of the growth of the human ovum and follicle. J Anat (Lond) 1951; 85: 373.

Green K, Svanborg K. On the mechanism of action of 15-methyl PGF₂ as an abortifacient. Prostaglandins 1979; 17: 277-282.

Greenwald GS, Terranova PF. Follicular selection and its control. In: Knobil E, Neill JJ (eds). The physiology of reproduction. Raven Press, New York, 1988; 387-445.

Gulyas B. Cortical granules of mammalian eggs. Int Rev Cytol 1980; 63: 357-392.

Gwatkin RBL, Williams DT. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. J Reprod Fertil 1977; 49: 55-59.

Hammer CE, Jennings LL, Sojka NJ. Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. J Reprod Fertil 1970; 23: 477-480.

Harper MJK. Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct. Biol Reprod 1973; 8: 441-450.

Harper MJK. Sperm and egg transport. In: Austin CR, Short RV (eds). Reproduction in mammals. Vol 1. Germ cells and fertilization. Cambridge University Press, Cambridge, 1982; 102-127.

Harper MJK. Gamete and zygote transport. In: Knobil E, Neill J (eds). The physiology of reproduction. Raven Press, New York, 1988; 103-134.

Hirao Y, Yanagimachi R. Development of pronuclei in polyspermic eggs of the golden hamster: Is there any limit to the number of sperm heads that are capable of developing into male pronuclei?. Zool Mag (Tokyo) 1979; 88: 24-33.

Huang TTF, Flemming AD, Yanagimachi R. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind and penetrate into zona pellucida: A study using guinea pig. J Exp Zool 1981; 217: 286-290.

Hunter RHF, Léglise PG. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. J Reprod Fert 1971; 24: 233-246.

Jequier AM, Cummins JM, Gearon C, Apted SL, Yovich JM, Yovich JL. A pregnancy achieved using sperm from the epidymal caput in idiopathic obstructive azoospermia. Fertil Steril 1990; 53: 1104-1105.

Jones R, Brown CR, Lancaster RT. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. Development 1988; 102: 781-792.

HOOFDSTUK 1

Jost A. Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Prog Horm Res* 1953; 8: 379-418.

Jost A. A new look at the mechanisms controlling sexual differentiation in mammals. *John Hopkins Med J* 1972; 130: 38-53.

Kornfeld R, Kornfeld S. Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. In: Lennarz WJ (ed). *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum Press, New York, 1980.

Koyama K, Hasegawa A, Isojima S. Effect of antisperm antibody on the in vitro development of rat embryos. *Gamete Res* 1984; 10: 143-152.

Kusan F, Flemming AD, Seidel G. Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa in the rabbit. *Fertil Steril* 1984; 41: 766-770.

Lambert H, Overstreet JW, Morales P, Hanson FW, Yanagimachi R. Sperm capacitation in the female reproductive tract. *Fertil Steril* 1985; 43: 325-327.

Langman J, *Inleiding tot de embryologie*. Bohn, Scheltema, Holkema. Utrecht. 1976.

Leese HJ, Biggers JD, Mroz EA, Lechene C. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem* 1984; 140: 443-448.

Leeuwenhoek A van. Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genitali animalculis. *Philos Trans R Soc London* 1678; 12: 1040.

Leveille MC, Roberts KD, Chevalier S, Chapdelaine A, Bleau G. Formation of the hamster zona pellucida in relation to ovarian differentiation and follicular growth. *J Reprod Fertil* 1987; 79: 173-183.

Lino BF, Braden AWH, Turnbull ED. Fate of unejaculated spermatozoa. *Nature* 1967; 213: 594-595.

Lipner H. Mechanism of mammalian ovulation. In: Knobil E, Neill JJ (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1988; 447-488.

Longo FJ. Pronuclear events during fertilization. In: Metz CB, Monroy A (eds). *Biology of fertilization*. Vol 3. Academic Press, Orlando, 1985; 251-298.

Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol* 1985; 101: 1501-1510.

Lunenfeld B, Kraiem Z, Eshkol A. The function of the growing follicle. *J Reprod Fertil* 1975; 66: 537-542.

Lundquist F. Aspects of the biochemistry of human semen. *Acta Phys Scan* 1949; 19 (Suppl 66):7-105.

MacLeod J, Hotchkiss RS. The distribution of spermatozoa and of certain chemical consti-

tuments in the human ejaculate. *J Urol* 1942; 48: 225.

Marle GAJS van. Parthenogenese. Proefschrift Erasmus Universiteit Rotterdam, 1983.

McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S. Histochemical observation on the germ cells of the human embryos. *Anat Rec* 1953; 117: 201-220.

Mintz B. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. *Science* 1962; 138: 594-597.

Mittwoch U. Parthenogenesis. *J Med Genet* 1978; 15: 165-181.

Miyazaki S, Hashimoto N, Yoshimoto Y, Kishimoto T, Igusa Y, Hiramoto Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intercellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev Biol* 1986; 118: 259-267.

Moghissi KS. Cyclic changes of cervical mucus in normal and progestin-treated women. *Fertil Steril* 1966; 663-675.

Mohri H, Yanagimachi R. Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa: A study using demembrated sperm model. *Exp Cell Res* 1980; 127: 191-196.

Mortimer D. The survival and transport to the site of fertilization of diploid rabbit spermatozoa. *J Reprod Fert* 1978; 51: 99-104.

Mortimer D, Leslie EE, Kelly RW, Templeton AA. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fert* 1982; 64: 391-399.

Moyer DL, Rimdusit S, Mishell DR. Sperm distribution and degradation in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol* 1970; 35: 831-840.

Naish SJ, Perreault SD, Foehner AL, Zirkin BR. DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: Sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol Reprod* 1987; 36: 245-253.

Nelson WO. Re-initiation of spermatogenesis in hypophysectomized rat. *Amer J Physiol* 1940; 129: 430-431.

Niwa K, Ohara K, Hoshi Y, Iritani A. Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert* 1985; 74: 657-660.

Overstreet JW, Cooper GW. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of transport. *Biol Reprod* 1978; 19: 101-114.

Pedersen T. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endo* 1970; 64: 304-323.

Peters H, Byskov AG, Faber M. Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. In: Peters H (ed). The development and maturation of the ovary and its functions. Excerpta Medica, Amsterdam, 1973; 20-23.

HOOFDSTUK 1

Phadke AM. Fate of spermatozoa in case of obstructive azoospermia and after ligation of vas deferens in man. *J Reprod Fertil* 1964; 7: 1-12.

Piko L, Tyler A. Fine structural studies of sperm penetration in the rat. Proceedings of the 5th international congress on animal reproduction. Trento, Italy. Vol 2, pp 372-374. 1964.

Pincus G, Enzmann E. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62: 665-675.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. *J Cell Biol* 1987; 104: 141-149.

Rijnders PM, Zeilmaker GH. Specificity of monoclonal antibodies directed against human acrosomal antigens. Abstracts from the 4th meeting of the ESHRE 1988; Barcelona, Spain.

Rodger JC, Bedford JM. Separation of sperm pairs and sperm-egg interaction in the opossum *Didelphis virginiana*. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 171-179.

Rowley M, Teshima JF, Heller CG. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril* 1970; 21: 390-396.

Sacco AG, Yurewicz EG, Subramanian MG. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP3 macromolecule (Mr 55000) of the pig zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 575-586.

Saling PM. Development of the ability to bind zonae pellucidae during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1981; 26: 429-436.

Sathananthan AH, Trounson AO. The human pronuclear ovum: Fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro. *Gamete Res* 1985; 12: 385-398.

Satoh M. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 1991; 177: 85-107.

Schatten H, Schatten G, Mazia D, Simery C, Balczon R. Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 105-109.

Schuel H. Functions of egg cortical granules. In: Metz CB, Monroy A (eds). *Biology of Fertilization*. Vol 3. Academic Press, Orlando, 1985; 1-43.

Setchell BP. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin CR, Short RV (eds). *Reproduction in mammals: 1. Germ cell and fertilization*. Cambridge University Press, Cambridge, 1982; 63-101.

Settlage DSF, Motoshima M, Tredway DF. Sperm transport from the external cervical os to the Fallopian tubes in women: A time and quantitation study. *Fertil Steril* 1973a; 24: 655-661.

Settlage DSF, Motoshima M, Tredway D. Sperm transport from the vagina to the Fallopian tubes in women. In: Hafez ESE, Thibault CG (eds). *The biology of spermatozoa*. Karger, Basel, 1973b; 63-73.

Shabanowitz RB, O'Rand MG. Molecular changes in the human zona pellucida associated with fertilization and human sperm-zona interactions. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541: 621-632.

Shimizu S, Tsuji M, Dean J. In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J Biol Chem* 1983; 258: 5858-5863.

Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991; 12 45-77.

Sorensen R, Wassarman P. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50: 531-536.

Soriano P, Jaenisch R. Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 1986; 46: 19-29.

Stewart-Savage J, Bavister BD. Success of fertilization in golden hamsters is a function of the relative gamete ratio. *Gamete Res* 1988; 21: 1-10.

Suarez SS, Katz DF, Overstreet JW. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* 1983; 29: 1277-1287.

Suarez SS, Katz DF, Meizel S. Changes in motility that accompany the acrosome reaction in hyperactivated hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1984; 10: 253-265.

Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 1992; 46: 686-691.

Tezon JG, Ramella E, Cameo MS, Vazquez MH, Blacquier JA. Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol Reprod* 1985; 32: 591-593.

Thompson D'A W. In: Smith JA, Ross WD (eds). The works of Aristotle translated into English. Vol. IV. *Historia animalium*. Oxford University Press, Oxford, 1910.

Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 1971; 16: 147-157.

Veck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.

Wassarman P, Schultz R, Letourneau G, LaMarca M, Bleil J. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. In: Channing C, Marsh J, Sadler W (eds). Ovarian follicular and corpus luteum function. New York, 1979; 251-268.

Wassarman PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987; 235: 553-554.

Wassarman P, Bleil J, Fimiani C, Florman H, Greve J, Kinloch R et al. The mouse egg receptor for sperm: a multifunctional zona pellucida glycoprotein. In: Dietl J (ed). The mammalian egg coat, structure and function. Springer-Verlag, Berlin, 1989; 18-37.

Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992; 46: 186-191.

HOOFDSTUK 1

Whitaker MJ, Steinhardt RA. Ionic signaling in the sea urchin egg at fertilization. In: Metz CB, Monroy A (eds). *Biology of fertilization*. Vol 3. Academic Press, Orlando, 1985; 167-221.

Wiqvist N, Widholm O, Nillius SJ, Nilsson B. Dysmenorrhoe and prostagladins. *Acta Obstet Gynaecol Scand (Suppl)* 1979; 87.

Wolf Dp. The mammalian eggs's block to polyspermy. In: Mastroianni L, Biggers JD (eds). *Mechanisms of fertilization and embryonic development in vitro*. Plenum Press, New York, 1981; 183-197.

Wolgemuth DJ, Celenza J, Bundman DS, Dunbar BS. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev Biol* 1981; 25: 439-450.

Woodruff JP, Pauerstein CJ. *The Fallopian tube. Structure, function, pathology and management*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1969.

Yanagimachi R, Chang MC. Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 1963a; 6: 413-420.

Yanagimachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 1963b; 200: 281-282.

Yanagimachi R. Time and process of sperm penetration into hamster ova in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1966; 11: 359-370.

Yanagimachi R, Noda YD. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J Ultrastruc Res* 1970; 31: 465-485.

Yanagimachi R, Mahi CA. The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea pig: A study in vivo. *J Reprod Fertil* 1976; 46: 49-54.

Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Biggers JD (Eds). *Mechanisms of fertilization and embryonic development in vitro*. Plenum Press, New York, 1981; 81-82.

Yanagimachi R, Philips DM. The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vitro. *Gamete Res* 1984; 9: 1-19.

Yanagimachi R, Kamiguchi K, Mikano K, Suzuki F, Yanagimachi H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the chinese hamster. *Am J Anat* 1985; 172: 317-330.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1988; 135-185.

Yang WH, Lin LL, Wang JR, Chang MC. Sperm penetration through zona pellucida and perivitelline space in hamster. *J Exp Zool* 1972; 179: 191-206.

HISTORIE VAN DE KWEEK VAN EICELLEN EN EMBRYO'S IN VITRO

Na de ontdekking van de eicel door von Baer (Baer,1827) was het Barry die in 1843 voor het eerst een zaadcel zag in de perivitelline ruimte van een konijneneicel (Barry,1843). Deze waarneming werd in de jaren daarop door diverse auteurs bevestigd (Bischoff,1854).

In 1876 zag Hensen een zaadcel in het cytoplasma van een konijneneicel (Hensen,1876). Een beschrijving van de penetratie van een zaadcel in de eicel van een zee-eigel werd in detail gegeven door Foll. Hij postuleerde toen al dat de 'bevruchtings-membraan' van de eicel een aanpassing ondergaat om polyspermie te voorkomen (Foll,1877).

Het bevruchtingsproces werd definitief opgehelderd door Van Beneden (1875) en Hertwig (1876) die de vorming van de mannelijke pronucleus uit de zaadcelkop beschrijven, waarna de mannelijke en de vrouwelijke pronucleus tezamen bijdragen aan het nieuwe embryo. Al snel werd het belang van deze ontdekkingen ingezien en werd geprobeerd deze processen in-vitro waar te nemen.

De eerste experimenten met het doel eicellen in-vitro te bevruchten werden verricht door Schenk met konijnen en cavia's (Schenk,1878). Zijn experimenten faalden. In 1890 was Walter Heape in staat om bij het konijn in-vivo ontstane embryo's te transplanteren van een donormoeder naar een draag(acceptor)moeder (Heape,1898).

In de jaren '30 werkte Pincus, eerst in Cambridge en later in Boston, samen met Enzmann aan de in-vitro bevruchting van konijneneicellen en transplantatie van de 'bevruchte' eicellen naar acceptormoeders. Zij konden echter niet aantonen dat de bevruchting in-vitro had plaatsgevonden. De eicellen werden getransplanteerd met aangehechte zaadcellen voordat aangetoond kon worden dat de bevruchting in-vitro had plaatsgevonden (Pincus,1934).

Daarna werkte Pincus samen met Hertig en Rock. Via laparotomie werden humane eicellen en embryo's opgespoord in de tubae. Rock en Menkin hebben ook gepoogd de humane eicellen, die zij op deze wijze verkregen, in-vitro te bevruchten (Rock,1946). In deze tijd begon ook Shettles in New York aan zijn experimenten met humane in-vitro-fertilisatie (Shettles,1955). Doordat hij echter nooit kon bewijzen dat bevruchting inderdaad in-vitro had plaatsgevonden en door de sterke morele ethische weerstand van collega's en pers in de USA, was hij niet in staat om zijn werk succesvol te continueren.

Over het resultaat van de studies van Menkin en Shettles bestaat veel twijfel. De kweekomstandigheden waarin deze onderzoekers hun experimenten verrichtten gaven waarschijnlijk eerder aanleiding tot fragmentatie en parthenogenese van eicellen dan tot bevruchting (Brackets,1972).

In de jaren '50 werden enkele grote problemen opgelost in de voortplantingsbiologie.

In 1949 gelukte het Hammond achtcellige muize-embryo's verder te kweken tot het blastocystestadium (Hammond,1949). In 1959 kon Whitten, werkzaam in Canberra, Australië, ééncellige muize-embryo's kweken tot het blastocyststadium. Het was voor het eerst dat de zgn. tweecelblokkade gepasseerd kon worden. Hij gebruikte hiervoor een Krebs-Ringer-bicarbonaatoplossing aangevuld met runderserumalbumine (Whitten,1956).

Het was Brinster die in 1965 de benodigde voedingsstoffen voor het pre-implantatie embryo vond en die de microdruppelkweektechniek, zoals die nu overal ter wereld voor IVF gebruikt wordt, ontwikkelde (Brinster,1965).

In 1959 kon Chang voor het eerst bewijzen dat in-vitro bevruchte konijneneicellen na transplantatie uitgroeiden tot gezonde nakomelingen (Chang,1959). Chang gebruikte voor de bevruchting een Krebs-Ringer-bicarbonaatoplossing en zaadcellen die eerst een in-vivo-capacitatie hadden ondergaan. Drie uur na inseminatie werden de eicellen overgezet in medium bestaande uit 50% konijneserum in fysiologisch zout. Na achttien uur kweek in een broedstoof bij 38C werden de bevruchte eicellen getransplanteerd naar de tubae van draagmoeders.

In 1968 kon Whittingham dit experiment herhalen bij de muis (Whittingham,1968). Whittingham gebruikte voor zijn kweek een Krebs-Ringer-bicarbonaatoplossing met daarin NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₂, KH₂PO₄ en NaHCO₃ waaraan Na-lactaat, Na-pyruvaat, glucose en 4 mg/ml BSA waren toegevoegd.

Bij al deze studies werden zaadcellen eerst in de uterus van vrouwelijke proefdieren gecapaciteerd voordat zij in-vitrogeïnsemineerd werden. Toentertijd werd gedacht dat capacitatie alleen in vivo kon plaatsvinden. Yanagimachi en Chang bewezen bij de Syrische hamster dat capacitatie ook in-vitro mogelijk was (Yanagimachi,1963). De zaadcellen werden uit de cauda epididymidis genomen en opgelost in een speciaal weefselkweek medium (TC 199, Difco Laboratories). Eicellen werden uit het oviduct geïsoleerd en in een horlogeglas bewaard onder minerale olie. Bevruchting kon worden aangetoond door de aanwezigheid van opgezwollen zaadcelkoppen en de aanwezigheid van het middendeel van de staart in het eicelcytoplasma.

De eerste studies met een bewijs van in-vitro-fertilisatie bij de mens, de aanwezigheid van twee pronuclei en het middendeel van de zaadcel in een eikel, waren van Edwards (Edwards,1969) en Shettles (Shettles,1971). Edwards nam preovulatoire oöcyten, verkregen per laparoscopie na een hormonale stimulatie. De kweekdruppels werden geïnsemineerd met zaadcellen. Bewerking van gameten en totstandkoming van bevruchting geschiedde in een medium bestaande uit een Tyrode-oplossing met een pH van 7,5-7,6, aangevuld met pyruvaat en BSA. Omdat de bevruchte eicellen niet verder groeiden dan het achtcellig stadium, werd een nieuw medium gebruikt bestaande uit HAM F10, aangevuld met humaan- en foetaalkalfserum, met een pH van 7,3. Hiermee werden voor het eerst humane blastocysten gekweekt (Steptoe,1971).

In 1973 schrijft Edwards dat zijn groep al bij 8 patiënten een embryotransfer heeft verricht, helaas zonder zwangerschap (Edwards,1973). Ook andere groepen beschrijven de transplantatie van humane embryo's (Kretzer,1973).

Pas in 1978 beschrijven Edwards en Steptoe de geboorte van een kind na in-vitro-fertilisatie (Steptoe,1978). Na een laparoscopische follikelpunctie op 10 november 1977, waarbij één oöcyt verkregen werd, werd tweeenhalve dag later één achtcellig embryo naar de uterus getransplanteerd. Op 25 juli 1978 werd hieruit middels sectio caesarea een meisje geboren.

2.1 REFERENTIES

- Baer CEA von.** De ovi mammalium et hominis genesi. Lepoldi Vossii, Lipsine. 1827.
- Barry M.** Spermatozoa observed within the mammiferous ovum. Phil Trans 1843; 133: 33.
- Beneden E van.** La maturation de l'oeuf, le fécondation et les premières phases du développement embryonnaire des mammifères d'après des recherches faites chez le lapin. Bull Acad Belg Cl Sci 1875; 40: 686.
- Bischoff TLW.** Bestätigung des von Dr Newport bei den Batzachiern und Dr Barry bei den Kaninchen behaupteten Eindringens der Spermatozoiden in das Ei. Giessen, 1854.
- Brackett BG, Seitz HM, Rocha G, Mastroianni L.** The mammalian fertilization process. In: Moghissie HS, Hafez ESE. Biology of mammalian fertilization and implantation. Thomas Books. Springfield; 1972: 165-184.
- Brinster RL.** Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. J Exp Zool 1965; 158: 59-68.
- Chang MC.** Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 1959; 184: 466.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC.** Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature 1969; 221: 632.
- Edwards RG.** Studies on human conception. Am J Obstet Gynec 1973; 117: 587-601.
- Foll H.** Sur les phénomènes intimes de la fecondation. C R Acad Sci, Paris 1877; 84: 268.
- Hammond J.** Recovery and culture of tubal mouse ova. Nature 1949; 163: 28-29.
- Heape W.** Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc R Soc London 1898; 62: 178-183.
- Hensen V.** Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kanin-chens und Meerschweinches. In Anat EntwGesch 1876; 1: 213.
- Hertwig O.** Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des tierisches Eies. Morph Jb 1876; 1: 347.
- Kretzer D de, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Lopata A et al.** Transfer of a human zygote. Lancet 1973; II: 728.
- Pincus G, Enzmann EV.** Can mammalian eggs undergo normal development in vitro?. Proc Nat Acad Sci USA 1934; 20: 121-122.
- Rock J, Menkin MF.** In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Science 1946; 100: 105-107.
- Schenk SL.** Das Sägethierei künstlich befruchtet ausserhalb des Mutterthieris. . Mitteilin-

HOOFDSTUK 2

gen aus dem Embryologischen Institute der KK Universität Wien 1878; 2: 107-118.

Shettles LB. Further observations on living human oocytes and ova. Am J Obst Gyn 1955; 69: 365-371.

Shettles LB. Human blastocyst grown in vitro in ovulation cervical mucus. Nature 1971; 229: 343.

Stephoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Human blastocysts grown in culture. Nature 1971; 229: 132.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; II: 366.

Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. Nature 1956; 177: 96.

Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. Nature 1968; 220: 592-593.

Yanagimachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. Nature 1963; 200: 281.

DE RELATIE TUSSEN SEMENPARAMETERS, BEVRUCHTING EN ZWANGERSCHAP BIJ IN-VITRO-FERTILISATIE.

RETROSPECTIEF ONDERZOEK NAAR DE RESULTATEN
VAN HET IVF-LABORATORIUM DIJKZIGT/AZR.

3.1 INLEIDING

IVF is momenteel een reguliere behandeling geworden in het geval van mannelijke infertiliteit. Om een inzicht te krijgen in de effectiviteit van een IVF-behandeling bij mannelijke infertiliteit moeten de resultaten vergeleken worden met de resultaten van de overige indicaties voor IVF.

Er zijn vele definities van mannelijke infertiliteit. Volgens de laatste WHO-definitie is sprake van mannelijke infertiliteit bij één van de volgende criteria of een combinatie van deze criteria: totaal aantal zaadcellen minder dan 20 miljoen/ml in het ejaculaat (oligozoöpermie), minder dan 40% bewegende zaadcellen in het ejaculaat (asthenozoöpermie), minder dan 50% morfologisch normale zaadcellen in het ejaculaat (teratozoöpermie).

Een verdeling van de patiënten in twee groepen met behulp van de WHO-criteria, bijvoorbeeld een groep met oligozoöpermie en een groep met normospermie, is echter vrij grof. Het is mogelijk om patiënten met verschillende zaadcelaantallen in meerdere categorieën in te delen (verder genoemd zaadcelcategorieën) en de resultaten van deze categorieën te vergelijken. Dit is dan ook de opzet geweest van deze retrospectieve studie.

Zaadcelaantallen werden in categorieën verdeeld en de relatie tussen zaadcelaantallen en bevruchting en de relatie tussen zaadcelaantallen en zwangerschap werden bestudeerd.

De belangrijkste semenparameter voor bevruchting is volgens de meeste auteurs de concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat. Wij hebben dan ook de relatie tussen de concentratie bewegende zaadcellen en bevruchting als uitgangspunt genomen. In het eerste deel van de studie (paragraaf 3.2) werden de behandelingsresultaten per punctie bestudeerd. De relatie tussen concentratie bewegende zaadcellen en bevruchting, zwangerschap, transplantatiebeleid en cryopreservatie werd bestudeerd. Ook werden de relaties tussen opzwemkwaliteit, zaadceloverleving en bevruchting en zwangerschap bestudeerd.

In het tweede deel van de studie (paragraaf 3.3) werd uitgegaan van de gemiddelde zaadcelconcentratie per patiënt. In dit deel van de studie werd niet naar het bevruchtigingspercentage gekeken, maar alleen naar de zwangerschapskans per patiënt. De zwangerschapskans werd zowel via het cumulatief zwangerschappercentage als via een zgn. cohortstudie berekend.

3.2. BEHANDELINGSRESULTATEN PER IVF-PUNCTIE

3.2.1 Materiaal en methoden

Alle puncties in de periode oktober 1988 tot en met april 1992 werden bestudeerd. De gegevens werden verkregen uit het databestand IRIS (Interactief Registratie en Identificatie Systeem). In dit databestand zijn de gegevens van de behandelingen op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt Ziekenhuis geregistreerd.

Per punctie worden de volgende gegevens genoteerd: naam en geboortedatum van de vrouw van het patiëntenpaar, een identificatienummer van het paar, het volgnummer van de behandeling, de indicatie voor deelname aan IVF, datum van de punctie en het ziekenhuis waar het klinische deel van de IVF-behandeling tot en met de punctie had plaatsgevonden.

Na de punctie wordt het aantal op het laboratorium gevonden eicellen genoteerd en wordt een onderverdeling in morfologisch goede of niet-goede eicellen gemaakt.

Van het semen worden de volgende parameters genoteerd: volume van het ejaculaat, het aantal bewegende en het aantal niet bewegende zaadcellen, de opzwemkwaliteit en de overleving van de zaadcellen 18 uur na opwerking.

Na de bevruchting worden de volgende gegevens vastgelegd: het aantal bevruchte eicellen, het aantal pronuclei per eicel 18 uur na inseminatie, het aantal embryo's dat getransplanteerd werd, enkele morfologische kenmerken van deze embryo's, het aantal ingevroren embryo's en een eventuele zwangerschap.

De m.b.v. IRIS vastgelegde resultaten werden met behulp van het statistisch computerpakket SPSS/PC+ versie 4.0 bewerkt, geselecteerd, gesorteerd en geanalyseerd. Een beschrijving van de bewerkingen van de data in IRIS volgt hierna. Deze bewerkingen werden gebruikt om begrippen als bevruchting en zwangerschap te definiëren en om goede vergelijkingen te kunnen maken.

Bij de berekening van het totaal aantal eicellen dat voor een IVF-behandeling gebruikt werd, werd het aantal eicellen gevonden na punctie verminderd met het aantal eicellen dat eventueel voor donatie werd afgestaan. Bij dit totaal aantal is geen onderscheid gemaakt naar morfologie van de eicellen. In de databank IRIS is wel een onderscheid gemaakt tussen goede en minder goede eicellen. Een morfologische indeling van eicellen is echter zeer subjectief, deze is zeer sterk afhankelijk van de criteria van de laboratoriummedewerker, van de criteria van het laboratorium en van de gebruikte microscoop voor inspectie. De beoordeling geschiedt bovendien op het uiterlijk van de cumulus, de eicel is door de vaak dichte cumuluslaag niet goed zichtbaar. Dit maakt het zeer moeilijk om b.v. een kiemblaasje of een poollichaampje bij de eicel te zien. Patiënten die donoreicellen kregen bij hun behandeling zijn ook opgenomen in de analyse.

Alleen puncties met een eicelopbrengst van meer dan drie eicellen werden in de analyse gebruikt. Als bij een punctie weinig eicellen gevonden worden (drie of minder) speelt niet alleen de kwaliteit van de zaadcellen maar ook de kwaliteit van de eicellen een grote rol bij het ontstaan van bevruchting. Indien er minder dan vier eicellen worden gevonden is de kans groot dat geen van de eicellen bevrucht wordt. Oorzaken hiervoor zijn de kwaliteit van de eicellen en de volgens een kansberekening grotere kans op het niet bevruchten van alle eicellen (Barlow,1990).

Bevruchting van eicellen werd gedefinieerd als de aanwezigheid van twee pronuclei 18 uur na de inseminatie en een goede doordeling van dit embryo. Indien na een punctie minstens één embryo ontstond werd dit gedefinieerd als een punctie met bevruchting. Indien geen embryo's ontstonden werd dit beschouwd als een punctie zonder bevruchting. Door per zaadcelcategorie het aantal puncties met bevruchting te delen door het totaal aantal puncties in die zaadcelcategorie kan de bevruchtungskans per punctie berekend worden. De kwaliteit van embryo's zoals vastgelegd in IRIS met het aantal blastomeren en gefragmenteerde cellen werd niet in de analyse gebruikt. Dit is het onderwerp van een aparte studie.

Zwangerschap werd gedefinieerd als een positieve zwangerschapstest 17 tot 20 dagen na de punctie. Verschillende in Nederland verkrijgbare zwangerschapstesten werden hiervoor gebruikt. Een zwangerschap met hartactie werd gedefinieerd als het bestaan van een echografisch gecontroleerde foetale hartactie 5 weken na de punctie.

De semenparameters die werden bestudeerd waren: het ejaculaatvolume, het aantal bewegende zaadcellen per ml, het aantal niet-bewegende zaadcellen per ml, de zgn. opzwemkwaliteit van de zaadcellen en de overleving van de zaadcellen na 18 uur. Zaadcelconcentraties lager dan één miljoen/ml werden in het IRIS genoteerd als een concentratie één miljoen/ml. Zaadcelconcentraties boven de honderdmiljoen/ml kregen alle de waarde honderdmiljoen/ml in IRIS. Patiënten die gebruik maakten van donorzaad werden voor deze studie uitgesloten. Met de bovenstaande in IRIS vermelde semenparameters konden het percentage bewegende zaadcellen en het totaal aantal bewegende zaadcellen in het gehele ejaculaat berekend worden.

De concentratie bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat met de bevruchting gaf na een regressieanalyse de hoogste correlatiecoëfficiënt. Parameters zoals de concentratie totaal aantal zaadcellen/ml en het percentage bewegende zaadcellen in het ejaculaat gaven een veel lagere correlatiecoëfficiënt met de bevruchting. Daarom werd voor deze studie de parameter concentratie bewegende zaadcellen/ml gekozen.

Omdat er een grote inter- en intra-observervariantie bestaat bij de telling van zaadcelaantallen (Menkveld, 1984), is het beter om voor een evaluatie van IVF-resultaten de zaadcelconcentraties in groepen te rangschikken. Op deze wijze werden zeven zaadcelcategorieën geformeerd, waarbij de concentraties steeds logaritmisch verschilden. Van deze zeven categorieën vallen de eerste drie onder de noemer oligoasthenospermie, een concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat van minder dan 8 miljoen/ml.

De kwaliteit van de embryo's werd behalve door een bestudering van het aantal zwangerschappen op twee andere manieren beoordeeld. Ten eerste door het aantal transplantaties van morfologisch goede embryo's vast te stellen en ten tweede door het aantal puncties waarbij embryo's ingevroren werden te noteren.

Voor transplantatie worden de beste embryo's verkozen. De regel op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt Ziekenhuis is dat bij een transplantatie van alleen morfologisch goede embryo's het aantal getransplanteerde embryo's lager is dan wanneer er morfologisch minder goede embryo's worden getransplanteerd. Vóór 8 oktober 1990 werden drie morfologisch goede dan wel vier morfologisch minder goede embryo's getransplanteerd. Na 8 oktober 1990 werden bij paren waarbij de vrouw ouder dan 33 jaar was drie morfologisch goede dan wel vier morfologisch minder goede embryo's getransplanteerd. Bij vrouwen van 33 jaar en jonger werden twee morfologisch goede dan wel drie morfologisch minder goede embryo's getransplanteerd. De reden voor

deze verandering na 8 oktober 1990 in het transplantatiebeleid was dat vooral bij vrouwen jonger dan 33 jaar veel meerlingzwangerschappen ontstonden.

Het percentage puncties met transplantatie van kwalitatief goede embryo's per zaadcelcategorie werd onderling vergeleken. Deze percentages geven een indruk over de embryokwaliteit per zaadcelcategorie.

Een tweede indicatie voor de kwaliteit van embryo's is het uitvoeren van **cryopreservatie**. Voor het invriezen van embryo's worden nl. alleen de kwalitatief goede embryo's gebruikt. Per punctie werd bekeken of het wel of niet tot invriezen van embryo's kwam en werd het aantal ingevroren embryo's geteld.

De laatste analyse van dit deel van de studie betrof de invloed van opzwemkwaliteit en overleving van de zaadcellen op bevruchting en zwangerschap.

Zowel voor de opzwemkwaliteit als de overleving zijn er vier groepen te onderscheiden: goed, redelijk, matig en slecht. Deze indeling is echter subjectief, de laboratorium-medewerker beoordeelt opzwemkwaliteit en overleving zoveel mogelijk aan de hand van de standaard zoals gebruikt in het laboratorium.

De totale aantallen eicellen, embryo's en hun gemiddelden per punctie werden berekend voor de verschillende categorieën van opzwemkwaliteit en overleving. Ook hier werd een analyse gemaakt waarbij alleen puncties met meer dan drie eicellen werden betrokken.

Als statistische toetsen werd gebruik gemaakt van Students T-test, Chi-kwadraat test of Fisher's exact test indien er te weinig puncties per groep waren.

3.2.2 Resultaten van IVF-behandelingen uitgedrukt per punctie.

Van de 3415 puncties in het tijdvak 1 oktober 1988 - 30 april 1992 waren er 2923 puncties met vier of meer eicellen, hiervan waren er 2447 met bevruchting (bevruchttingspercentage van 83,7%). Er waren 492 puncties met drie of minder eicellen. Bij 325 van deze 492 puncties ontstond bevruchting (bevruchttingspercentage van 66,1%).

De puncties werden in zeven categorieën onderverdeeld. In iedere categorie werd uitgegaan van de concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat. De concentraties werden in groepen verdeeld zodanig dat er per groep voldoende aantallen puncties waren en de groepen onderling voldoende verschilden in zaadcelconcentratie en verwacht bevruchttingspercentage. De eerste categorie bestaat uit alle puncties met een concentratie van 1 miljoen bewegende zaadcellen/ml en lager (waarde in IRIS van één miljoen bewegende zaadcellen/ml). De tweede categorie bestaat uit alle puncties met concentraties tussen 1 en 4 miljoen bewegende zaadcellen/ml. Voor iedere volgende categorie bestaat de hoogste concentratie uit een verdubbeling van de laagste concentratie. Op deze manier bleken er voldoende aantallen puncties per categorie te zijn en werden representatieve bevruchttingspercentages gevonden (zie tabel 3.1). In tabel 3.1 is het aantal puncties, het bevruchttingspercentage, het zwangerschapspercentage en het percentage zwangerschappen met een positieve hartactie voor de verschillende zaadcelcategorieën vermeld.

SEMENPARAMETERS, BEVRUCHTING EN ZWANGERSCHAP BIJ I.V.F.

TABEL 3.1: Gemiddelde concentratie bewegende zaadcellen/ml, aantal puncties, bevruchtingspercentage, zwangerschapspercentage en percentage zwangerschappen met hartactie voor zeven verschillende zaadcelcategorieën

| Categorie (zaadcel- aantallen min-max, in 10 ⁶ /ml) | Gemiddeld aantal bewegende zaadcellen 10 ⁶ /ml ± s.d | # puncties | # puncties met bevruchting (%) ¹ | # puncties met positieve zwanger- schapstest (%) ² | # zwanger- schappen met hartactie (%) ³ |
|--|---|------------|--|---|--|
| 1 (1) | - | 38 | 16 (34,0) | 3 (18,8) | 3(18,8) |
| 2 (1-4) | 3,0 ± 0,8 | 129 | 74 (57,4) | 20 (27,0) | 17(23,0) |
| 3 (4-8) | 6,3 ± 1,1 | 170 | 118 (69,4) | 34 (28,8) | 25(21,2) |
| 4 (8-16) | 12,5 ± 2,3 | 343 | 265 (77,3) | 78 (29,4) | 69(26,0) |
| 5 (16-32) | 24,8 ± 4,5 | 609 | 515 (84,6) | 156 (30,3) | 143(27,8) |
| 6 (32-64) | 47,6 ± 8,5 | 829 | 713 (86,0) | 206 (28,9) | 182(25,5) |
| 7 (64-100) | - | 805 | 746 (92,7) | 215 (28,8) | 180(24,1) |

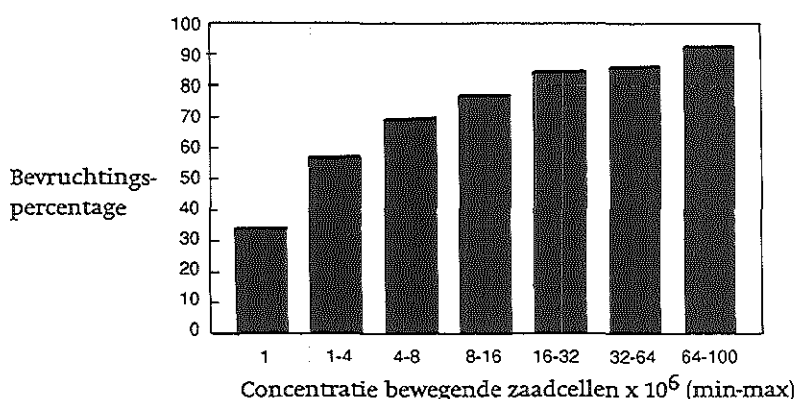
1 Alle groepen statistisch significant verschillend ($p < 0,05$): behalve groep 3 versus groep 4 en groep 5 versus groep 6.

2 Geen statistisch significante verschillen in deze kolom ($p > 0,05$).

3 Percentage t.o.v. puncties met bevruchting. In deze kolom geen statistisch significante verschillen ($p > 0,05$).

Het meest opvallend in tabel 3.1 is dat er geen statistisch significante verschillen bestaan tussen de zaadcelcategorieën wat betreft het percentage zwangerschappen en het percentage doorgaande zwangerschappen.

In figuur 3.1 is de concentratie bewegende zaadcellen uitgezet tegen het bevruchtigingspercentage (kolom 4, tabel 3.1).



Figuur 3.1: Bevruchtigingspercentage t.o.v. de concentratie bewegende zaadcellen/ml voor zeven verschillende zaadcelcategorieën.

De resultaten voor de zeven verschillende zaadcelcategorieën kunnen behalve voor het aantal puncties in iedere categorie ook voor het aantal eicellen en embryo's in

iedere categorie berekend worden. Deze resultaten staan in tabel 3.2 vermeld.

Omdat uit tabel 3.1 blijkt dat bij de zaadcelcategorieën met lagere aantallen zaadcellen het aantal puncties met bevruchting lager is dan bij hogere zaadcelcategorieën (kolom 4 tabel 3.1), werd het totaal aantal eicellen en embryo's zowel berekend voor het totaal aantal puncties als alleen voor de puncties met bevruchting (waarbij minstens één eicel bevrucht werd). In tabel 3.2 zijn deze puncties vermeld.

TABEL 3.2: Totaal aantal eicellen en embryo's per zaadcelcategorie en hun gemiddelden per punctie (bij puncties met meer dan drie eicellen).

| Zaadcel- categorie (min-max x10 ⁶ /ml) | # puncties totaal | | | | # puncties met bevruchting | | | |
|--|-------------------|----------------------|--------------------------------------|---|----------------------------|----------------------|---|---|
| | # eicel len | # embryo's (%) | Gem. # eicellen per punctie | Gem. # embryo's per punctie ² | # eicel- len | # embryo's (%) | Gem. # eicellen per punctie ¹ | Gem. # embryo's per punctie ¹ |
| 1 (1) | 407 | 63 (15,5) | 10,7 ± 6,9 | 1,7 ± 2,4 | 176 | 63 (35,8) | 11,0 ± 5,9 | 3,9 ± 2,2 |
| 2 (1-4) | 1485 | 358 (24,1) | 11,5 ± 6,8 | 2,8 ± 3,6 | 898 | 358 (39,9) | 12,1 ± 7,6 | 4,8 ± 3,5 |
| 3 (4-8) | 1852 | 628 (33,9) | 10,9 ± 6,8 | 3,7 ± 4,4 | 1357 | 628 (46,3) | 11,5 ± 7,0 | 5,3 ± 4,4 |
| 4 (8-16) | 3648 | 1493 (40,9) | 10,6 ± 6,1 | 4,4 ± 4,2 | 2811 | 1493 (53,1) | 10,6 ± 6,0 | 5,6 ± 4,0 |
| 5 (16-32) | 6596 | 3162 (47,9) | 10,8 ± 6,8 | 5,2 ± 4,9 | 5666 | 3162 (55,9) | 11,0 ± 7,0 | 6,1 ± 4,7 |
| 6 (32-64) | 8603 | 4232 (49,1) | 10,4 ± 6,8 | 5,1 ± 4,7 | 7599 | 4232 (55,7) | 10,7 ± 7,1 | 5,9 ± 4,6 |
| 7 (64-100) | 8490 | 4519 (53,2) | 10,5 ± 6,6 | 5,6 ± 4,5 | 7901 | 4519 (57,2) | 10,6 ± 6,6 | 6,1 ± 4,4 |

¹ Students-t, geen statistisch significante verschillen binnen de kolom ($p > 0,05$)

² Students-t, de groepen 1, 2 en 3 verschillen van de groepen 5, 6 en 7 ($p < 0,05$). Groep 4 verschilt van groep 7 ($p < 0,05$).

Het gemiddeld aantal eicellen is dus zowel voor alle puncties als voor puncties met bevruchting statisch niet significant verschillend (kolommen 4 en 8 van tabel 3.2).

Het gemiddeld aantal embryo's tussen de verschillende zaadcelcategorieën is voor alle puncties wel statistisch significant verschillend ($p < 0,05$) (kolom 5 van tabel 3.2).

Bij de puncties met bevruchting werden geen statistisch significante verschillen gevonden tussen de gemiddelde aantallen embryo's per zaadcelcategorie (kolom 9 tabel 3.2). M.a.w. als alleen puncties met bevruchting bestudeerd worden zijn er geen verschillen meer voor het aantal ontstane embryo's.

De al eerder vermeldde parameters voor embryokwaliteit nl. transplantatie van morfologisch goede embryo's en cryopreservatie van embryo's zijn opgenomen in tabel 3.3 en tabel 3.4.

In tabel 3.3 is het aantal puncties per zaadcelcategorie met transplantatie van kwalitatief goede embryo's vergeleken met het aantal puncties met transplantatie van kwalitatief minder goede embryo's. Deze vergelijking werd alleen gemaakt voor puncties waarbij meer embryo's ontstaan waren dan er uiteindelijk werden getransplanteerd. De aantallen werden per zaadcelcategorie (zoals in Tabel 4.1 en Tabel 4.2) uitgezet.

TABEL 3.3: Aantal puncties met transplantatie van morfologisch goede embryo's versus het aantal puncties met transplantatie van minder goede embryo's, per zaadcelcategorie.

| Zaadcelcategorie (min-max x10 ⁶ /ml) | # Puncties met transplan- tatie van kwalitatief minder mooie embryo's (%) | # Puncties met transplan- tatie van kwalitatief mooie embryo's (%) |
|--|---|--|
| 1 (1) | 9 (90,0) | 1 (10,0) |
| 2 (1-4) | 26 (65,0) | 14 (35,0) |
| 3 (4-8) | 42 (58,3) | 30 (41,7) |
| 4 (8-16) | 113 (63,8) | 64 (36,2) |
| 5 (16-32) | 217 (59,9) | 145 (40,1) |
| 6 (32-64) | 306 (62,4) | 184 (37,6) |
| 7 (64-100) | 313 (59,4) | 214 (40,6) |

Er zijn geen statistisch significante verschillen tussen de zaadcelcategorieën in tabel 3.3 (Chi²-toets, p>0,05). De kans op transplantatie van morfologisch goede embryo's is bij alle zaadcelcategorieën even groot.

In tabel 3.4 is het aantal puncties waarbij embryo's konden worden ingevroren en het gemiddeld aantal ingevroren embryo's per zaadcelcategorie voor iedere zaadcelcategorie uitgezet.

TABEL 3.4: Puncties met cryo-embryo's en gemiddeld aantal ingevroren embryo's per zaadcelcategorie.

| Zaadcelcategorie (min-max x10 ⁶ /ml) | # puncties met cryopreservatie (%) ¹ | gemiddeld # ingevro- ren embryo's (±s.d.) ³ |
|--|--|---|
| 1 (1) | 3 (18,8) | 3,0 ± 0,0 |
| 2 (1-4) | 16 (21,6) | 3,3 ± 1,6 |
| 3 (4-8) | 32 (27,1) | 5,0 ± 1,9 |
| 4 (8-16) | 83 (31,3) | 4,1 ± 1,7 |
| 5 (16-32) | 162 (31,5) | 4,7 ± 2,0 |
| 6 (32-64) | 207 (29,0) ² | 4,7 ± 2,2 |
| 7 (64-100) | 268 (35,9) ² | 4,5 ± 2,0 |

1 aantal puncties met cryopreservatie/totaal aantal puncties met bevruchting x 100

2 significant verschillend (Chi²-toets, p<0,05)

3 geen significante verschillen tussen de groepen (Students T-test, p>0,05)

Uit tabel 3.4 blijkt dat het percentage van de puncties waarbij embryo's ingevroren konden worden bij op één na alle zaadcelgroepen gelijk is. Zaadcelgroep 7 vormt een uitzondering. Zoals te zien in tabel 3.4 kunnen in deze zaadcelgroep vaker embryo's worden ingevroren dan in de overige groepen.

De relatie tussen opzwemkwaliteit en overleving van het semenmonster en bevruchtigingspercentage, zwangerschapspercentage en percentage doorgaande zwangerschappen zijn in tabel 3.5 uitgezet. Alleen de puncties waarbij opzwemkwaliteit en overleving in IRIS vermeld zijn, zijn opgenomen.

HOOFDSTUK 3

TABEL 3.5: Relatie tussen opzwemkwaliteit en overleving met bevruchtingspercentage, zwangerschapspercentage en percentage zwangerschappen met hartactie voor puncties met meer dan 3 eicellen.

| Groep | Opzwemmen | | | | Overleving | | | |
|----------|------------|--------------------------------|--|--|------------|--------------------------------|--|--|
| | # puncties | # puncties met bevruchting (%) | # puncties met pos. zwangerschapstest(% ¹) | # puncties met positieve hartactie (% ²) | # puncties | # puncties met bevruchting (%) | # puncties met pos. zwangerschapstest(% ¹) | # puncties met positieve hartactie (% ²) |
| goed | 1960 | 1764 (89,9) | 526 (29,9) | 466 (88,6) | 2393 | 2135 (89,2) | 624 (29,2) | 545 (87,3) |
| redelijk | 501 | 397 (79,2) | 112 (28,2) | 91 (81,3) | 332 | 233 (70,2) | 65 (27,9) | 53 (81,5) |
| matig | 293 | 188 (64,2) | 51 (27,1) | 43 (84,3) | 142 | 61 (43,0) | 18 (29,5) | 16 (88,9) |
| slecht | 152 | 94 (61,8) | 22 (23,4) | 18 (81,8) | 53 | 17 (32,1) | 4 (23,5) | 4 (100,0) |

1. Percentage t.o.v. het aantal puncties met bevruchting

2. Percentage t.o.v. het aantal puncties met een positieve zwangerschapstest

Statistiek zie tekst onder tabel

De kolommen 2 en 6 van tabel 3.5 vermelden verschillende aantallen puncties omdat b.v. niet alle puncties met de kwalificatie goed bij het opzwemmen ook de kwalificatie goed krijgen voor de overleving. Dit geldt natuurlijk ook omgekeerd.

Uit tabel 3.5 blijkt dat de meeste groepen statistisch significant verschillen voor wat betreft het bevruchtingspercentage, zowel in relatie tot opzwemkwaliteit als tot overleving. Alleen de groepen matig en slecht zijn niet verschillend (Chi²-toets, $p > 0,05$). Voor het zwangerschapspercentage en het percentage zwangerschappen met hartactie zijn geen statistisch significante verschillen aantoonbaar (Chi²-toets, $p > 0,05$).

3.2.3 Discussie

Doel van deze studie was de bestudering van de invloed van de ons bekende semenparameters op bevruchting en zwangerschap.

Al snel na de toepassing van IVF bij infertiele paren, werden analyses gemaakt betreffende het resultaat van IVF bij mannelijke infertiliteit (Yovich,1984; Mahadevan,1983; Cohen,1984; de Kretser,1985). In al deze studies konden maar weinig patiëntenparen bestudeerd worden. Nu veel grotere aantallen patiënten behandeld zijn, is het mogelijk beter gefundeerde uitspraken te doen over de resultaten na IVF.

Behalve de in deze studie bestudeerde parameters: concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat, opzwemkwaliteit van zaadcellen en overleving van de zaadcellen, bestaan nog vele andere parameters.

Een bekende parameter die vaak bestudeerd wordt is de zaadcelmorfologie. De sterk uiteenlopende meningen over de criteria van goede zaadcelmorfologie en het gebruik van verschillende technieken voor de morfologische analyse hebben ons

ervan weerhouden deze parameter te bestuderen.

Een andere parameter is de hoeveelheid geïnsemineerde zaadcellen per eicel. Gebruik van deze parameter stuit echter op veel praktische problemen. Van de kweekdruppel zou het volume en de concentratie bewegende zaadcellen bekend moeten zijn. Zulke druppels kunnen echter alleen op het moment van de inseminatie gemaakt worden en hebben dan minder lang kunnen equilibreren in de broedstoof. Normaal worden de kweekdruppels 16 uur geëquilibreerd in de broedstoof teneinde een goed gebufferd medium te verkrijgen en dit het bevruchttingspercentage en de embryonale ontwikkeling verbetert. Inseminatie met een bekende concentratie zaadcellen wordt in de meeste laboratoria niet routinematig uitgevoerd. Er vindt altijd een schatting plaats van de hoeveelheid geïnsemineerde zaadcellen, in ons laboratorium is dat 50.000 tot 100.000 zaadcellen per eicel.

De totale zaadcelconcentratie en de concentratie bewegende zaadcellen kunnen tussen de verschillende laboratoria goed vergeleken worden. Maar zelfs bij tellingen met de Maklertelkamer, waarbij een semenmonster niet verdund hoeft te worden, blijven problemen bestaan (Menkveld, 1984). Verschillende monsters uit één ejaculaat kunnen verschillende resultaten geven, verschillende waarnemers geven verschillende resultaten en zelfs in één monster uit één ejaculaat kan één waarnemer op twee verschillende momenten nog verschillen vinden. Daarom hebben wij ervoor gekozen om de zaadcelconcentraties te groeperen. Aan de ene kant hebben wij geprobeerd de groepen zo homogeen mogelijk te maken ten aanzien van het resultaat, aan de andere kant hebben wij gepoogd de groepen even groot te maken ten aanzien van het aantal puncties. Aan deze voorwaarden kon het best voldaan worden door categorieën te onderscheiden met logaritmisch verschillende zaadcelconcentraties.

Uit tabel 3.1 blijkt dat tussen een aantal zaadcelcategorieën statistisch significante verschillen bestaan ($p < 0,05$). Belangrijker dan deze verschillen is echter het feit dat zelfs bij zaadcelcategorie 1 (1 miljoen/ml) nog een redelijk bevruchttingspercentage wordt gezien (34,0%) en dat het bevruchttingspercentage oploopt van zaadcelcategorie tot zaadcelcategorie. De verschillen in bevruchttingspercentage worden echter steeds kleiner. De verschillen zijn het grootst in de zaadcelcategorieën die onder de noemer oligoasthenospermie vallen (zaadcelgroepen 1 (1 miljoen/ml), 2 (1-4 miljoen/ml) en 3 (4-8 miljoen/ml)). Bij hogere concentraties zijn de verschillen kleiner.

Als er eenmaal bevruchting is, is de kans op zwangerschap en op een positieve foetale hartactie bij de verschillende zaadcelcategorieën statistisch niet significant verschillend. Hoewel de aantallen puncties en zwangerschappen in zaadcelgroep 1 lager zijn dan in de overige groepen, is al wel de voorzichtige conclusie te trekken dat embryo's uit alle zaadcelgroepen even goed in staat zijn om tot zwangerschap te leiden.

Deze resultaten werden ook gevonden door Tournaye et al. (Tournaye, 1992). In hun studie werd een groep patiënten met mannelijke infertiliteit (gedefinieerd volgens WHO-normen) vergeleken met een groep patiënten met goede semenparameters bij IVF. Ook zij vonden een lager bevruchttingspercentage bij mannelijke infertiliteit. Verder vonden zij bij de puncties met bevruchting (waarbij dus minstens één embryo ontstond) gemiddeld een lager aantal embryo's bij de groep mannelijke infertiliteit dan bij de andere groep. Zij wijten dit aan een mogelijk verminderd bevruchtend vermogen van de zaadcellen. In onze studie vonden wij dit niet. In tabel 3.2 is immers te zien dat de aantallen embryo's bij de verschillende zaadcelcategorieën statistisch niet

significant verschillen (als er tenminste sprake is van bevruchting, kolom 9 uit tabel 3.2). Het aantal puncties in de studie van Tournaye is vergelijkbaar met dat in onze studie. Tournaye bekeek alle puncties ongeacht oöcytopbrengst, wij bekeken alleen de puncties met meer dan drie eicellen. Hoeveel puncties met een lage eicelopbrengst het resultaat in de studie van Tournaye beïnvloed hebben is onbekend. Na transplantatie van embryo's werd door Tournaye geen verschil in zwangerschapspercentage gevonden. Dit bevestigt onze conclusie dat eenmaal ontstane embryo's in iedere zaadcelgroep evenveel kans hebben om tot een zwangerschap te leiden.

Deze conclusie wordt echter niet onderschreven door Englert et al. (Englert, 1987). In hun studie wordt mannelijke infertiliteit vergeleken met patiënten met normale semenparameters bij IVF. Zij vinden een lagere bevruchtungskans per punctie bij mannelijke infertiliteit, maar tevens dat als er eenmaal embryo's ontstaan zijn, paren met mannelijke infertiliteit een grotere kans hebben op zwangerschap dan de overige paren (mannelijke infertiliteit 44% zwangerschapskans, overige paren 22% zwangerschapskans). Een verklaring voor deze vondst is dat bij ernstige mannelijke infertiliteit het vruchtbaarheidspotentieel van de vrouw wordt verhuld. Hoe minder de ernst van de mannelijke infertiliteit des te groter de kans dat ook bij de vrouw een vruchtbaarheidsprobleem bestaat. Dit wordt ook gevonden bij de resultaten na donorinseminatie. Bij paren met een azoöspermie is het zwangerschapspercentage na donorinseminatie hoger dan bij paren met een oligozoöspermie (Empereire, 1982).

Zowel in de studie van Tournaye (Tournaye, 1992) als in onze studie wordt dit niet bevestigd. Als er eenmaal embryo's bestaan, is de kans op zwangerschap bij alle paren even groot. Het zgn. vruchtbaarheidspotentieel bij de vrouw is bij alle zaadcelgroepen even groot of het bestaat gewoonweg niet.

Uit tabel 3.2 blijkt dat als er eenmaal sprake is van bevruchting de zaadcelcategorieën onderling niet verschillen in het gemiddeld aantal embryo's per punctie. Een lagere concentratie zaadcellen geeft geen aanleiding tot lagere bevruchtingspercentages per punctie.

De twee methoden die door ons zijn gebruikt zijn om de embryokwaliteit te bepalen zijn het transplanteren van kwalitatief goede embryo's en de kans op het invriezen van embryo's per punctie. Uit de tabellen 3.3 en 3.4 blijkt dat embryo's uit op één na alle zaadcelcategorieën evenveel kans hebben om een goede beoordeling te krijgen bij transplantatie dan wel om ingevroren te worden. Er kunnen geen statistisch significante verschillen gevonden worden.

Groep 7 (64-100 miljoen/ml) vormt een uitzondering, hier konden bij relatief meer patiënten embryo's ingevroren worden dan bij de andere categorieën. De aantallen eicellen en embryo's blijken in deze categorie (Tabel 3.2) niet groter te zijn dan in de andere categorieën. Een verklaring voor dit feit kan dan ook niet gegeven worden.

De aantallen embryo's die ingevroren kunnen worden per zaadcelcategorie zijn niet statistisch significant verschillend, ook zaadcelcategorie 7 heeft een zelfde percentage ingevroren embryo's als de overige categorieën (Tabel 3.4).

De parameters opzwemkwaliteit en overleving van zaadcellen blijken in tabel 3.5 duidelijk gecorreleerd te zijn met het bevruchtingspercentage. Behalve de kwalificaties matig en slecht zijn alle groepen statistisch significant verschillend, zowel voor opzwemkwaliteit als voor overleving. Bij het zwangerschapspercentage en het percentage zwangerschappen met een positieve hartactie werden geen verschillen gevonden. Net als voor de zaadcelcategorieën uit tabel 3.1 zou gesteld kunnen worden dat de

opzwekwaliteit of de overleving van de zaadcellen wel de bevruchtungskans beïnvloedt maar niet de zwangerschapskans na embryo-transplantatie.

3.3 BEHANDELINGSRESULTATEN PER PATIENT.

3.3.1 Inleiding

Het succespercentage van IVF kan niet alleen per punctie maar ook per patiënt bestudeerd worden. Een patiënt ondergaat vaak meerdere puncties. Het meest interessant is natuurlijk het zwangerschapspercentage te bepalen per patiënt na een aantal puncties. Niet alle patiënten ondergaan echter evenveel puncties. Dit aantal wordt bepaald door het succes (een zwangerschap), het falen (geen bevruchting) en de motivatie van het patiëntenpaar. Door patiënten weer in verschillende zaadcelcategorieën te verdelen kan naar een verschil in succes tussen de verschillende categorieën gezocht worden.

3.3.2 Materiaal en methoden

Opnieuw werd gebruik gemaakt van de databank IRIS om alle gegevens van IVF-patiënten te verzamelen en te analyseren.

Om alle behandelingen van zoveel mogelijk patiënten te bestuderen werden patiënten genomen die hun eerste behandeling tussen 1 oktober 1988 en 30 oktober 1991 kregen. De tweede en verdere pogingen van patiënten werden vervolgd tot 30 april 1992. Binnen een periode van 6 maanden (1 oktober 1991 - 30 april 1992) hebben de meeste patiënten die met IVF doorgaan na hun eerste poging ook hun tweede poging ondernomen. Bij deze analyse werden alleen patiënten betrokken die bij al hun puncties meer dan drie eicellen hadden.

Ook in deze studie werd uitgegaan van de concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat. De concentraties werden voor iedere patiënt gemiddeld en daarna werden opnieuw zeven zaadcelcategorieën gemaakt: 1 (tot 1 miljoen), 2 (1-4 miljoen), 3 (4-8 miljoen), 4 (8-16 miljoen), 5 (16-32 miljoen), 6 (32-64 miljoen) en 7 (64-100 miljoen).

Om de zwangerschapskans van de patiënten in de verschillende categorieën te berekenen werden twee methoden gebruikt: het zgn. cumulatief zwangerschapspercentage en de zgn. cohortstudie. Zwangerschap werd gedefinieerd als een echografische bevestiging van foetale hartactie vijf weken na de IVF-punctie.

Voor de berekening van het cumulatief zwangerschapspercentage wordt uitgegaan van het volgnummer van de IVF-punctie. In iedere zaadcelcategorie wordt het aantal patiënten geteld dat een eerste IVF-punctie ondergaat (volgnummer 1), het aantal zwangeren werd geteld en het percentage zwangerschappen berekend. Het aantal patiënten dat een tweede punctie ondergaat (volgnummer 2) werd geteld, het aantal zwangeren geteld, en het cumulatief zwangerschapspercentage berekend volgens de methode van Guzik (Guzik, 1986). Het cumulatief zwangerschapspercentage is gelijk aan: $1 - (\text{niet-zwangeren-percentage in punctie } n) \times (\text{niet-zwangeren-percentage in punctie } (n-1)) \dots \times (\text{niet-zwangeren-percentage in punctie } 1)$.

Bij de cohortmethode volgens Paterson (Paterson, 1987) worden alle patiënten ver-

HOOFDSTUK 3

volgd die in een bepaalde periode met de IVF-behandeling gestart zijn, in ons geval van 1 oktober 1988 tot 30 oktober 1991. De behandelingen van deze patiënten worden vervolgd tot een einddatum, in ons geval 30 april 1992.

In deze periode werd per zaadcelcategorie gekeken naar het aantal zwangeren van het aantal patiënten dat één IVF-punctie ondergaan had, naar het aantal zwangeren van het aantal patiënten dat twee IVF-puncties ondergaan had, etc. Zo kan binnen iedere zaadcelcategorie het aantal zwangeren en het totaal aantal patiënten geteld worden en het zwangerschapspercentage binnen het cohort berekend worden.

3.3.3 Resultaten van IVF-behandelingen per patiënt

In de periode 1 oktober 1988 tot 30 oktober 1991 zijn 1236 patiënten aan een behandeling begonnen. In Tabel 3.6 is het aantal patiënten vermeld dat een eerste, een tweede, een derde etc. IVF-punctie ondernam en het aantal patiënten dat zwanger werd bij deze pogingen. De aantallen zwangerschappen en patiënten zijn per zaadcelcategorie vermeld. Tevens werd het cumulatief zwangerschapspercentage na iedere punctie berekend.

TABEL 3.6: Cumulatief zwangerschapspercentage en volgnummer van de IVF-punctie per zaadcelcategorie, berekend volgens Guzik (Guzik,1986).

| Zaadcel- categorie (min- max x10 ⁶ /ml) | # zwangerschappen/# puncties (cumulatief zwangerschapspercentage) | | | | | | | |
|--|---|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| | 1* | 2* | 3* | 4* | 5* | 6* | 7* | 8* |
| 1 (1) | 0/18 (0%) | 0/2 (0%) | - | - | - | -- | - | - |
| 2 (1-4) | 10/45 (22,2%) | 1/19 (26,3%) | 0/6 (26,3%) | 0/1 (26,3%) | - | - | - | - |
| 3 (4-8) | 5/64 (7,8%) | 8/31 (31,6%) | 1/10 (38,4%) | 0/2 (38,4%) | 1/1 (100%) | - | - | - |
| 4 (8-16) | 23/143 (16,1%) | 12/61 (32,6%) | 8/26 (53,3%) | 2/10 (62,7%) | - | - | - | - |
| 5 (16-32) | 61/256 (23,8%) | 25/133 (38,1%) | 12/50 (53,0%) | 4/15 (65,5%) | 1/6 (71,3%) | 1/2 (85,6%) | 1/1 (100%) | - |
| 6 (32-64) | 88/384 (22,9%) | 32/220 (34,1%) | 16/102 (44,5%) | 9/32 (60,1%) | 3/14 (68,6%) | 1/7 (73,1%) | 0/3 (73,1%) | 1/2 (86,6%) |
| 7 (64-100) | 77/326 (23,6%) | 37/167 (40,5%) | 20/69 (57,8%) | 7/16 (76,2%) | 2/4 (88,1%) | 1/2 (94,1%) | - | - |
| Totaal | 264/1236 (21,4%) | 115/633 (35,6%) | 57/263 (49,6%) | 22/76 (64,2%) | 7/25 (74,2%) | 3/11 (81,2%) | 1/4 (85,9%) | 1/2 (93,0%) |

*Volgnummer van de IVF-punctie

In tabel 3.6 is b.v. te zien dat in zaadcelcategorie drie 31 patiënten een tweede IVF-punctie ondergaan. Bij deze tweede IVF-punctie worden er 8 patiënten zwanger. Dit

geeft een cumulatief zwangerschapspercentage in zaadcelcategorie drie van 31,6% na twee IVF-puncties.

Uit tabel 3.6 blijkt dat het aantal patiënten dat een eerste punctie ondergaat veel groter is dan het aantal patiënten dat daarna een tweede punctie onderneemt. Dit geldt ook voor de verdere puncties. Patiënten met hogere semenwaarden ondergaan meer puncties dan patiënten met lagere semenwaarden.

In tabel 3.7 staan dezelfde patiënten afgebeeld als in tabel 3.6 maar dan gerangschikt naar het totaal aantal pogingen dat zij ondernomen hebben. In kolom twee staan de aantallen patiënten vermeld die maar één IVF-punctie ondergingen en het aantal zwangeren uit deze groep. In kolom drie staan de aantallen patiënten vermeld die twee IVF-puncties ondergingen en de aantallen zwangeren na twee puncties. Op deze manier is een zgn. cohortonderzoek te doen en is het totale zwangerschapscijfer te geven, d.w.z. het aantal gestarte patiënten in een bepaalde periode dat zwanger is geworden.

Tabel 3.7: Aantal IVF-puncties per patiënt verdeeld naar verschillende zaadcelcategorieën.

| Zaadcel- groep (min- max x 10 ⁶ /ml) | # zwangerschappen/#patiënten (zwangerschapspercentage) | | | | | | | | Totaal |
|---|--|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| | 1* | 2* | 3* | 4* | 5* | 6* | 7* | 8* | |
| 1 (1) | 0/16 (0%) | 0/2 (0%) | - | - | - | - | - | - | 0/18 (0%) |
| 2 (1-4) | 10/26 (38,5%) | 1/13 (7,7%) | 0/5 (0%) | 0/1 (0%) | - | - | - | - | 11/45 (24,4%) |
| 3 (4-8) | 5/33 (15,2%) | 8/21 (38,1%) | 1/8 (12,5%) | 0/1 (0%) | 1/1 (100%) | - | - | - | 15/64 (23,4%) |
| 4 (8-16) | 23/82 (28,0%) | 12/35 (34,3%) | 8/16 (50%) | 2/10 (20%) | - | - | - | - | 45/143 (31,5%) |
| 5 (16-32) | 61/123 (49,6%) | 25/83 (30,1%) | 12/35 (34,3%) | 4/9 (44,4%) | 1/5 (25,0%) | 1/1 (100%) | 1/1 (100%) | - | 105/256 (41,0%) |
| 6 (32-64) | 88/164 (53,7%) | 32/118 (27,1%) | 16/70 (22,9%) | 9/18 (50,0%) | 3/7 (42,9%) | 1/4 (25,0%) | 0/1 (0%) | 1/2 (50,0%) | 150/384 (39,1%) |
| 7 (64-100) | 77/159 (48,4%) | 37/98 (37,8%) | 20/53 (37,7%) | 7/12 (58,3%) | 2/2 (100%) | 1/2 (50,0%) | - | - | 144/326 (44,2%) |
| Totaal | 264/603 (43,8%) | 115/370 (31,1%) | 57/187 (30,5%) | 22/51 (43,1%) | 7/14 (50,0%) | 3/7 (42,9%) | 1/2 (50,0%) | 1/2 (50,0%) | 470/123 6 (38%) |

*Totaal aantal IVF puncties

In de laatste kolom van tabel 3.7 staat het totaal aantal zwangeren en het totaal aantal patiënten uit iedere zaadcelcategorie vermeld. In zaadcelcategorie drie waren er b.v. in totaal 64 patiënten die aan IVF begonnen, 15 van deze 64 patiënten werden zwanger (23,4%).

De zwangerschapspercentages van de eerste drie zaadcelcategorieën zijn statistisch significant verschillend van de laatste drie zaadcelcategorieën (Chi²-toets, p<0,05).

3.3.4 Discussie

De prognose van een patiëntenpaar kan alleen bepaald worden als een kansberekening wordt gemaakt van de paren die al een IVF behandeling ondergaan hebben. Door patiënten gedurende hun behandeling te vervolgen kan de kans voor verschillende paren bepaald worden. Een methode om de zwangerschapskans van een paar te bepalen is het gebruik maken van het zogenaamde cumulatieve zwangerschapspercentage. Dit percentage geeft aan welk percentage van de paren na een bepaald aantal opeenvolgende IVF-behandelingen een zwangerschap bereikt zal hebben. Deze methode is afgeleid van de berekening van het cumulatief sterftcijfer zoals toegepast door Berkson en Gage (Berkson,1950). Door Guzik et al. werd deze methode aangepast voor de berekening van het cumulatief zwangerschapspercentage na een infertiliteitsbehandeling (Guzik,1982). Guzik heeft deze methode ook toegepast voor de IVF-behandeling (Guzik,1986).

In tabel 3.6 is deze methode toegepast. Omdat na de derde punctie nog maar weinig patiënten verder gaan met IVF, is een goede analyse alleen voor de eerste drie puncties mogelijk. Het cumulatief zwangerschapspercentage is, behalve voor zaadcelcategorie 1, voor geen van de zaadcelcategorieën tijdens de eerste drie pogingen statistisch significant verschillend (methode van Lee en Desu, $p < 0,05$) (Lee,1972).

Zoals te zien in tabel 3.6 zijn de eerste drie zaadcelcategorieën wat betreft het aantal patiënten veel kleiner dan de overige zaadcelgroepen.

Het nadeel van het gebruik van het cumulatief zwangerschapspercentage is dat het geen rekening houdt met patiënten die eerder stoppen met IVF. Bij de berekening van het cumulatief zwangerschapspercentage wordt er van uit gegaan dat de patiënten die stoppen met de behandeling bij verdere IVF-puncties evenveel succes zouden hebben als de patiënten die wel verdergaan. De werkelijkheid is echter anders. Patiënten stoppen met IVF door het tegenvallend succes en door de psychische belasting. Deze waarden worden wel meegenomen als het zwangerschapspercentage berekend wordt zoals bij de cohortmethode uit tabel 3.7.

Patiënten worden hierbij gedurende hun gehele IVF-behandeling vervolgd. Zwangerschapspercentages worden berekend naar aanleiding van het aantal zwangerschappen over het totaal aantal gestarte patiënten, ongeacht het aantal pogingen per patiënt.

De cohortbenadering van IVF-resultaten werd ook gebruikt door Paterson (Paterson,1987) en door Haan (Haan,1991). Deze studies zijn echter moeilijk te vergelijken met onze studie. Haan nam als uitgangspunt alle patiënten met hun eerste IVF-behandeling binnen een periode van een half jaar en vervolgde deze patiënten gemiddeld anderhalf jaar. Hij vond een zwangerschapspercentage van 29,7% (253 van de 852 gestarte paren met een positieve zwangerschapstest). Paterson volgde een cohort van 200 paren gedurende 39 maanden. Er werden 63 vrouwen uit deze groep zwanger (31,5%).

In onze studie vond een selectie plaats doordat niet alle met IVF gestarte patiënten genomen werden, maar alleen patiënten die tot een punctie kwamen. Bovendien werd geselecteerd op een minimum eicelopbrengst van drie eicellen. Onze cijfers zijn dan ook positief vertekend t.o.v. de andere twee studies.

De totale zwangerschapscijfers van de eerste drie groepen verschillen statistisch significant van de laatste drie groepen (Chi²-toets, $p < 0,05$).

Het totale zwangerschapscijfer van zaadcelgroep 1 (0%) is niet bemoedigend. Dit lage percentage wordt natuurlijk ook verklaard door het lage aantal patiënten in deze groep en het lage aantal patiënten dat meerdere puncties ondergaat. Het is echter niet te verwachten dat bij deelname van meer patiënten uit deze zaadcelgroep veel meer zwangerschappen ontstaan, IVF blijft voor deze patiëntengroep een discutabele behandeling.

De zaadcelgroepen 2 en 3 hebben een zeer acceptabel zwangerschapspercentage 24,4% respectievelijk 23,4%. Als er meer patiënten uit deze groepen zouden zijn die meerdere pogingen zouden ondergaan is het zelfs mogelijk dat het zwangerschapspercentage verder stijgt, gezien de goede resultaten van deze patiënten per poging.

Onze conclusie is dan ook dat patiënten met lage zaadcelaantallen een goede kans hebben op zwangerschap bij IVF. Deze patiënten moet dan ook aangemoedigd worden verder te gaan met de IVF-behandelingen ondanks het uitblijven van een zwangerschap.

3.4 REFERENTIES

Barlow P, Englert Y, Puissant F, Lejeune B, Delvigne A, Rysselberge M van, Leroy F. Fertilization failure in IVF: why and what next?. Hum Reprod 1990; 5: 451-456.

Berkson J, Gage RP. Calculation of survival rates for cancer. Mayo Clin Proc 1950; 25: 270.

Cohen J, Fehilly CG, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC. Male infertility successfully treated by in vitro fertilization. Lancet 1984; 1: 172-179.

Emperaire JC, Gaugere-Soumireu E, Adebart AJ. Female fertility and donor insemination. Fertil Steril 1982; 37: 90.

Englert Y, Vekemans M, Lejeune B, Rysselberge M van, Puissant F, Degueldre M, Leroy F. Higher pregnancy rates after in vitro fertilization and embryo transfer in cases with sperm defects. Fertil Steril 1987; 48: 254-257.

Guzick DS, Bross DS, Rock JA. A parametric method for comparing cumulative pregnancy curves following infertility therapy. Fertil Steril 1982; 37: 503-507.

Guzick DS, Wilkes C, Jones HW. Cumulative pregnancy rates for in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 663-667.

Haan G, Bernardus RE, Hollanders JMG, Leerentveld RA, Prak FM, Naaktgeboren N. Results of IVF from a prospective multicentre study. Human Reprod 1991; 6: 805-810.

Kretser DM de, Yates CA, Kovacs GT. The use of IVF in the management of male infertility. Clin Obstet Gynaecol 1985; 12: 767-773.

Lee E, Desu M. A computer program for comparing k samples with right-censored data. Comp Prog in Biomedic 1972; 2: 315-321.

Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. The relationship of tubal blockage infertility of

an unknown cause, suspected male infertility and endometriosis to success of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1983; 40: 755-762.

Menkveld R, Zyl JA van, Kotze TJ van. A statistical comparison of three methods for the counting of human spermatozoa. *Andrologia* 1984; 16: 554.

Paterson P, Chan C. What proportion of couples undergoing unrestricted in vitro fertilization treatments can expect to bear a child?. *J of IVF/ET* 1987; 4: 334-337.

Tournaye H, Devroey P, Camus M, Staessen C, Bollen N, Smits J, Steirteghem AC van. Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 year survey. *Human Reprod* 1992; 7: 218-222.

Yovich JL, Stanger JD. The limitations of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. *J Vitro Fert Embryo Trans* 1984; 1: 172-179.

HET GEBRUIK VAN PERCOLL VOOR HET OPWERKEN VAN ZAADCellen BIJ ANDROLOGISCHE EN ONBEGREPEN INFERTILITEIT.

4.1 INLEIDING

Om een eicel te bevruchten is slechts één zaadcel nodig. Toch moeten bij een in-vitro-inseminatie vele tienduizenden zaadcellen worden gebruikt om één eicel te bevruchten (Wolf, 1984). Een selectie van de meest mobiele zaadcellen geeft volgens sommigen het hoogste bevruchtingspercentage.

Deze selectie kan op verschillende wijzen plaatsvinden. Veelgebruikte methoden zijn de opzwemmethode, gecombineerd centrifugeren en opzwemmen en de gradiëntcentrifugering. De techniek waarmee de beste selectie plaatsvindt, de minste schade aan de zaadcellen wordt berokkend en de zaadcellen het best van de seminale plasma gescheiden kunnen worden heeft de voorkeur.

Het onderzoek naar de effectiviteit van de gradiëntcentrifugering kan het best toegepast worden bij de patiëntengroepen met een verwacht laag bevruchtingspercentage. Dit zijn de patiënten die met een nieuwe methode een beter resultaat met behulp van IVF kunnen verkrijgen. De groepen met het laagste bevruchtingsresultaat bij IVF bestaan uit patiënten met een andrologische indicatie en patiënten met onbegrepen infertiliteit.

Voor een vergelijking tussen beide methoden is in dit onderzoek gekozen voor een vergelijking binnen de patiënt. Hiervoor werden de oöcyten van één patiënt verdeeld in twee groepen én werd het semenmonster in twee delen gesplitst. Een deel van het semenmonster werd via de centrifugering/opzwemmethode verwerkt, het andere deel via een Percoll-gradiëntscheiding. De ene helft van de eicellen werd met zaadcellen van de centrifugering/opzwemprocedure geïnsemineerd. De andere helft van de eicellen werd met de zaadcellen van de Percoll-methode geïnsemineerd. Na afloop werden de bevruchtingspercentages vergeleken. Op deze wijze kan een vergelijking naar bevruchtingsresultaat binnen één patiëntenpaar per punctie gemaakt worden.

4.2 MATERIAAL EN METHODEN

4.2.1 Patiënten

Gedurende 9 maanden werden patiënten voor dit onderzoek geselecteerd. Het betrof patiënten waarbij om verschillende redenen werd getwijfeld aan het te verwachten bevruchtingsresultaat. De indicaties die voor het onderzoek golden waren:

- A. semenanalyses met minder dan 12 miljoen bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat (andrologische indicatie)
- B. bij de IVF-punctie minder dan 20 miljoen bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat en bekend met betere semenanalyses
- C. onbegrepen infertiliteit
- D. vorige IVF-poging(en) zonder bevruchting van de eicellen.

De vrouw onderging een routinematige ovariële hyperstimulatie met HMG (Humegon[®], Organon, Oss) en ovulatieïnductie met HCG (Pregnyl[®], Organon, Oss). 35 Uur na HCG-gift vond onder echografische controle een vaginale follikelpunctie plaats. In het laboratorium werden de eicellen met cumulus geïsoleerd en overgeplaatst naar een druppel medium onder olie. De eicellen werden aselekt verdeeld over twee tot zes kweekschaaftjes.

Het semen werd een half uur na produktie onderzocht. Het volume werd gemeten en het aantal bewegende en niet bewegende zaadcellen geteld m.b.v. een Makler-telkamer (Sefi Medical Instruments, Israel). Het semen werd daarop in twee gelijke delen verdeeld. Een deel werd via de centrifugering/opzwemmethode (C/O) verwerkt, het andere deel via de Percoll-methode.

4.2.2 Centrifugering/opzwemmethode

Het semen werd gemengd met een overmaat GPO-medium (zie tabel 4.1) in een 15 ml reageerbuis en gecentrifugeerd bij een snelheid van 1000 g gedurende 5 minuten. Bovenstaand medium werd na centrifugering afgegoten en de pellet werd opgelost in 10 ml medium. Opnieuw vond centrifugering plaats (1000 g gedurende 5 minuten). Weer werd de bovenstaande vloeistof afgegoten totdat ongeveer 0,5 ml medium op het sediment achterbleef. Drie uur na centrifugering werd een deel van het supernatant, waarin de zaadcellen zijn opgezwommen, afgenomen en gebruikt voor inseminatie van de kweek.

Tabel 4.1 GPO-medium

| Chemicaliën | hoeveelheid |
|---|--------------|
| NaCl | 115,67 mM |
| KCl | 5,37 mM |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,81 mM |
| NaHCO ₃ | 24,00 mM |
| NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O | 1,01 mM |
| Glucose | 5,55 mM |
| Na-pyruvaat | 0,18 mM |
| Ca-lactaat | 2,20 mM |
| HAM-F10 | 1,731 g/l |
| GPO | 8,8 volume % |

4.2.3 Percoll-methode

Vooraf werd een zgn. 100%-Percoll-oplossing gemaakt. Deze bestond uit een 10-voudig geconcentreerde HAM-F10-oplossing (Gibco, Paisley, Groot-Brittannië) aangevuld met natriumbicarbonaat en HEPES (Merck, Darmstad, Duitsland). Dit werd aangevuld met Percoll (Pharmacia, Uppsala, Zweden) totdat een oplossing met een osmolariteit van 280-285 mOsmol ontstond. Percoll bestaat uit silicaboolletjes bedekt met polyvinylpyrrolidon (PVP). Het heeft een dichtheid van 1.130 g/ml en een osmolaliteit van minder dan 25 mOs/kg H₂O.

Als eerste werd 2.475 g HAM-F10 en 0.7425 g HEPES en 0.2625 g NaHCO₃ opgelost in 25 ml zuiver water (Analar[®], BDH, Poole, Engeland). Voor een osmolariteit van 280 mOsmol moet normaliter één deel geconcentreerde HAM-F10-oplossing gemengd worden met negen delen van de Percoll-oplossing die een zeer lage osmotische waarde heeft.

De osmolariteit van een oplossing is echter afhankelijk van de hoeveelheid vrij water. Bij Percoll is de hoeveelheid vrij water afhankelijk van de osmolariteit van de Percoll-oplossing (Vermeiden, 1990). Deze osmolariteit wordt bepaald door de HAM-F10-oplossing. Daarom moet 1 deel geconcentreerde HAM-F10-oplossing gemengd worden met ongeveer 10.5 delen Percoll om een osmolariteit van 280 mOsmol te krijgen. Op deze wijze ontstaat een Percoll-mengsel met de juiste dichtheid en de juiste osmolariteit. Dit werd de 100%-Percoll-oplossing genoemd.

Deze 100%-oplossing werd aangevuld met GPO-medium tot twee nieuwe oplossingen, één van 80 volumepercenten Percoll (80% Percoll) en één van 40 volumepercenten Percoll (40% Percoll).

Bij de verwerking van het semen werd eerst 2,5 ml 80% Percoll-oplossing in een 15 ml buis gepipetteerd, daarboven werd de 40% Percoll-oplossing gepipetteerd en daarboven het semen. De buis werd gecentrifugeerd gedurende 15 min bij 500 g. De buis werd voorzichtig uit de centrifuge genomen en de bovenste twee lagen (de seminale vloeistof en de 40% Percoll-oplossing) werden afgepipetteerd evenals de intermediaire laag die zich tussen de 40% en 80% laag bevond. De 80% laag werd gemengd met een overmaat GPO-medium en gecentrifugeerd gedurende 5 minuten bij 1000 g. De bovenstaande vloeistof werd afgegoten zodat nog ongeveer 0,5 ml vloeistof boven op de pellet aanwezig was. Twee tot vier uur na de verwerking werd een deel van deze bovenstaande vloeistof, waarin zaadcellen uit het sediment zijn opgezwommen, afgenomen voor inseminatie.

4.2.4 Inseminatie

De centrifugering/opzwemmethode en de Percoll-methode werden voor ieder semen-monster tegelijkertijd uitgevoerd. Tussen 2 en 4 uur na bewerking werden de druppels, waarin zich de eicellen bevonden, geïnsemineerd. De eicellen waren aselekt verdeeld over een even aantal kweekschaaftjes. De helft van de kweekschaaftjes werd met de opgezwommen zaadcellen uit de centrifugering/opzwemmethode geïnsemineerd, de andere helft met de opgezwommen zaadcellen uit de Percoll-bewerking. Beide inseminaties werden steeds verricht door één laboratoriummedewerker.

4.2.5 Pronucleusinspectie en transplantatie

Achttien uur na inseminatie werden de eicellen geïnspecteerd op pronucleusvorming. Eicellen die twee pronuclei bezaten en daarna doordeelden werden als bevrucht beschouwd. Eicellen met drie of meer pronuclei werden niet meer verder gekweekt. Voor transplantatie werden embryo's uit beide groepen gebruikt. Twee of drie dagen na de punctie vond de transplantatie plaats. Er werden drie of vier embryo's getransplanteerd, steeds de morfologisch beste embryo's. Een goede morfologie wordt bepaald door een gelijkmatige deling van de blastomeren en door de afwezigheid van fragmenten.

Zeventien dagen na de punctie kon een zwangerschapstest verricht worden. In dit experiment werd dit als eindpunt genomen.

4.3 RESULTATEN

Zoals te zien is in tabel 4.2 zijn er in totaal 124 patiënten die aan het onderzoek hebben deelgenomen. Deze patiënten werden in de vier bovenstaande groepen verdeeld:

- A. patiënten met semenanalyses met minder dan 12 miljoen bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat.
- B. patiënten die bij de IVF-poging minder dan 20 miljoen bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat bleken te bezitten.
- C. patiënten die hun eerste IVF-poging kregen met als IVF indicatie onbegrepen infertiliteit.
- D. patiënten die bij eerdere IVF-pogingen geen bevruchting hadden.

Omdat eicellen en zaadcellen per patiëntenpaar werden verdeeld zijn de bevruchtingsresultaten bekend van beide methoden van semenverwerking. Dit betekent dat de patiënten naar het bevruchtingsresultaat in vier categorieën verdeeld kunnen worden nl.:

1. geen bevruchting met zaadcellen verwerkt met de Percoll-methode en geen bevruchting met zaadcellen verwerkt met de centrifugering/opzwemmethode (Percoll -, C/O -).
2. wel bevruchting met de Percoll-methode, maar niet met de centrifugering/opzwemmethode (Percoll +, C/O -).
3. geen bevruchting met de Percoll-methode, maar wel met de centrifugering/opzwemmethode (Percoll -, C/O +).
4. bevruchting met de Percoll-methode en de centrifugering/opzwemmethode (Percoll +, C/O +).

PERCOLL

TABEL 4.2: Aantal patiënten met verschillende indicaties voor Percoll-gebruik en hun resultaten met beide methoden van semenverwerking

| Indicatie Percoll | # Patiënten | Percoll - C/O -(1) | Percoll + C/O - | Percoll - C/O + | Percoll + C/O + | Stat. sign.(2) |
|-------------------|-------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| A | 82 | 24 | 24 | 2 | 32 | p<0,001(3) |
| B | 12 | 0 | 3 | 0 | 9 | p=0,25 |
| C | 7 | 1 | 1 | 1 | 4 | p=1 |
| D | 23 | 8 | 6 | 0 | 9 | p=0,0313(3) |
| Totaal | 124 | 33 | 34 | 3 | 54 | p<0,001(3) |

(1) Percoll +/- = wel of geen bevruchting met zaadcellen opgewerkt via de Percoll methode

C/O +/- = wel of geen bevruchting met zaadcellen opgewerkt via de centrifugering/opzwevmethode

(2) Volgens test van McNemar

(3) statistisch significant (p<0,05)

Beschrijving groepen A, B, C en D zie tekst

De aantallen gebruikte eicellen, de ontstane embryo's en de multipronuclei embryo's bij patiënten uit de verschillende Percoll-indicatiegroepen zijn vermeld in Tabel 4.3.

TABEL 4.3: Aantallen eicellen, embryo's en multipronuclei embryo's, ontstaan na inseminatie met Percoll bewerkt semen of na routine (C/O) bewerking, verdeeld naar indicatie voor Percoll gebruik

| Indicatie | # eicellen | | # embryo's | | stat. sign.(1) | # multipron. embryo's | | stat. sign.(2) |
|-----------|------------|-----|------------|-----|----------------|-----------------------|-----|----------------|
| | Percoll | C/O | Percoll | C/O | | Percoll | C/O | |
| A | 528 | 476 | 210 | 100 | p<0,001 | 16 | 11 | p=0,37 |
| B | 78 | 75 | 43 | 40 | p=0,81 | 6 | 4 | p=0,88 |
| C | 41 | 36 | 23 | 12 | p=0,118 | 0 | 2 | p=0,27 |
| D | 131 | 118 | 41 | 19 | p<0,01 | 4 | 1 | p=0,97 |
| Totaal | 778 | 705 | 317 | 171 | p<0,001 | 26 | 18 | p=0,44 |

(1) Chi²-toets van het aantal twee pronuclei embryo's t.o.v. het aantal onbevruchte eicellen

(2) Chi²-toets van het aantal multipronuclei embryo's t.o.v. het aantal twee pronuclei embryo's

Statisch significant indien p<0,05.

Beschrijving groepen A, B, C en D zie tekst

Uit tabel 4.2 en 4.3 blijkt dus dat voor groep A en groep D Percoll-behandeling tot statistisch significant betere resultaten leidt, zowel per patiënt als per behandelde eicel. In tabel 4.2 wordt aangetoond dat er meer patiënten zijn die bevruchting hebben met Percoll en in tabel 4.3 dat, zoals verwacht, meer embryo's ontstaan in de Percoll-groep dan in de C/O-groep.

De vraag is nu of de Percoll-methode ook tot hogere bevruchtingsresultaten leidt bij patiënten die zowel met C/O als met Percoll bevruchting hebben. Deze gegevens staan vermeld in tabel 4.4.

HOOFDSTUK 4

TABEL 4.4: Aantallen gebruikte eicellen en ontstane embryo's na inseminatie met d.m.v. Percoll bewerkt semen of na routine (C/O) bewerking, verdeeld naar indicatie voor Percoll-gebruik (bij patiënten die bevruchting hebben met beide methoden)

| Indicatie | # eicellen | | # embryo's | | Stat. sign. ⁽¹⁾ |
|-----------|------------|-----|------------|-----|----------------------------|
| | Percoll | C/O | Percoll | C/O | |
| A | 198 | 177 | 135 | 96 | p<0,005* |
| B | 66 | 64 | 38 | 40 | p=0,70 |
| C | 24 | 23 | 21 | 11 | p<0,01* |
| D | 45 | 43 | 22 | 19 | p=0,44 |
| Totaal | 333 | 307 | 216 | 166 | p<0,005* |

(1) Chi²-toets van het aantal bevruchte eicellen t.o.v. het aantal onbevruchte eicellen statistisch significant (p<0,05)

Beschrijving groepen A, B, C en D zie tekst

Uit Tabel 4.4 kan men de conclusie trekken dat het percentage bevruchte eicellen met Percoll-gebruik ook hoger is als de C/O-methode ook tot bevruchting leidt.

Behalve naar de bevruchttingsresultaten werd ook naar de zwangerschapspercentages gekeken.

In Tabel 4.5 staan de zwangerschapsresultaten van de verschillende indicatiegroepen vermeld.

TABEL 4.5: Aantal zwangerschappen per aantal behandelde patiënten in iedere Percoll-indicatie groep

| Indicatie | # patiënten | # patiënten met bevruchting | # zwangerschappen | % zwanger/ #patiënten ⁽¹⁾ | % zwanger/ #patiënten met bevruchting ⁽²⁾ |
|-----------|-------------|-----------------------------|-------------------|---|---|
| A | 82 | 58 | 16 | 19,5 | 27,6 |
| B | 12 | 12 | 3 | 25,0 | 25,0 |
| C | 7 | 6 | 3 | 42,9 | 50,0 |
| D | 23 | 15 | 3 | 13,0 | 20,0 |
| Totaal | 124 | 91 | 25 | 20,2 | 27,5 |

(1) statistisch geen verschil tussen de groepen A, B, C en D in deze kolom (Chi²=3,159; D.F.=3; p=0,367)

(2) statistisch geen verschil tussen de groepen A, B, C en D in deze kolom (Chi²=1,985; D.F.=3; p=0,575)

Beschrijving groepen A, B, C en D zie tekst

Patiënten kregen embryo's getransplanteerd die of afkomstig waren uit de Percoll-groep, of embryo's uit de centrifugerings/opzwemgroep, of een transplantatie van een combinatie van beide groepen embryo's. Embryo's voor transplantatie werden geselecteerd op grond van hun morfologische kwaliteit ongeacht hun herkomst. Het zwangerschapsresultaat in relatie tot de categorie getransplanteerde embryo's staat vermeld in Tabel 4.6.

PERCOLL

TABEL 4.6: Zwangerschapsresultaten na transplantatie van embryo's ontstaan na bevruchting met opgewerkt semen (C/O versus Percoll)

| Categorie getransplanteerde embryo's | # patiënten | # zwangerschappen (%) [*] |
|--------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| 'Percoll' embryo's | 45 | 11 (24,4) |
| 'C/O' embryo's | 7 | 1 (14,3) |
| 'Percoll' en 'C/O' embryo's | 39 | 13 (33,3) |
| Totaal | 91 | 25 (27,5) |

^{*} statistisch niet significant verschillend ($\chi^2=1,49$; D.F.=1; $p=0,475$)

De morfologie van de embryo's komt tot uiting in de keuze voor transplantatie, morfologische goede embryo's worden eerder geselecteerd voor transplantatie dan morfologisch minder goede embryo's. Indien bij een patiënt een keuze mogelijk is tussen 'Percoll' embryo's en 'C/O' embryo's om te transplanteren, zegt de verhouding tussen de aantallen getransplanteerde embryo's uit de twee verschillende groepen iets over de morfologie van deze embryo's. De ratio "aantal getransplanteerde embryo's/aantal embryo's ontstaan" kan tussen de twee groepen vergeleken worden. Met een teken-toets kan de statistische significantie berekend worden.

Bij de 54 patiënten met bevruchting in beide groepen waren er 19 patiënten die meer 'Percoll' embryo's getransplanteerd kregen, 19 patiënten die meer 'C/O' embryo's getransplanteerd kregen, en 16 patiënten waarbij het aantal gelijk was. Een berekening volgens de Tekentoets van Wilcoxon geeft een tweezijdige p-waarde van 0,4464, m.a.w. er is geen significant verschil in morfologie tussen 'Percoll' en 'C/O' embryo's.

4.4 DISCUSSIE

Scheiding van zaadcellen en het seminale plasma wordt al geruime tijd toegepast omdat de zaadcellen anders niet in staat zijn eicellen in-vitro te bevruchten. Het seminale plasma bevat factoren die de motiliteit van de zaadcellen en ontwikkeling van het bevruchtend vermogen remmen (Gellert-Mortimer,1988).

In-vivo worden zaadcellen en het seminale plasma van elkaar gescheiden door het slijm in de cervicale mucus. Behalve deze scheiding verdeelt het slijm van de cervix ook de verschillende klassen zaadcellen. De zaadcellen worden nl. geselecteerd op hun morfologie, hun motiliteit en op hun kernstabiliteit (Katz,1978). De zaadcellen die op deze manier geselecteerd worden zijn in staat om in een 1:1 verhouding de eicel te bevruchten (Cummins,1982; zie ook paragraaf 1.3.7).

Om ook in-vitro een zodanige selectie te kunnen maken, zijn verschillende opwerkmethoden ontwikkeld: opzwemmen van zaadcellen uit het semen in medium, centrifugering tezamen met het opzwemmen van zaadcellen, albuminekolommen, glaswolkolommen, Sephadex-kolommen en Ficoll-kolommen (Forster,1983).

Wij hebben gekozen voor een vergelijking van de bij ons routinematig gebruikte centrifugering/opzwemmethode met de Percoll-scheiding. Het werken met Percoll is technisch eenvoudig (Gorus,1981), er zijn studies over de veiligheid van Percoll bekend en de resultaten zijn veelbelovend.

Na een scheiding m.b.v. de centrifugering/opzwemmethode blijft ongeveer 18% van de bewegende zaadcellen over (Gellert-Mortimer,1988), Percoll is in staat 60% van

de bewegende, morfologisch normale zaadcellen uit te selecteren (Berger,1985). Percoll selecteert zaadcellen met een betere overleving (Guerin,1989), met een betere motiliteit (Akerlof,1987) en met de beste nucleaire rijping (Le Lannou,1988). Een enkele studie spreekt dit echter tegen (Ng,1992).

Zaadcellen die met de Percoll-methode zijn geselecteerd hebben een hogere score in de hamstereicelpenetratietest dan zaadcellen die via de opzwemmethode worden geselecteerd (Forster,1983; Berger,1985; Leventhal,1987).

Het bevruchtigingspercentage van humane oöcyten zou na Percoll-behandeling verhoogd worden en ook het zwangerschapspercentage zou na Percoll-benadeling hoger zijn dan na toepassing van de opzwemmethode (Van der Zwalm,1991; Guérin,1989).

Veiligheidsstudies zijn verricht waarbij de schade aan de zaadcel door Percoll-partikels (Iizuka,1988), bacteriële contaminatie en immunologische reacties op Percoll werden gecontroleerd (Pickering,1989).

Percoll bestaat uit silicapartikels bezet met PVP, waarvan de dichtheid verhoogd is tot 1,13 g/ml zonder dat de osmotische druk toeneemt. Dit voorkomt schade aan de zaadcellen (Iizuka,1988). Na een selectie van zaadcellen m.b.v. een Percoll-gradiënt en het wassen van de zaadcellen met medium bleek dat bijna geen silicadeeltjes op het zaadceloppervlak achterbleven. Ook werden met de elektronenmicroscopie geen beschadigingen op het zaadceloppervlak gevonden (Pickering,1989).

Percoll kan bacteriën uit het seminale plasma verwijderen, hoe groter de dichtheid van de Percoll-laag des te lager de bacterieconcentratie (Bolton,1986). Na intraperitoneale injectie van Percoll bij proefdieren bleken de silicapartikels wel gefagocyteerd te worden door leucocyten, maar niet tot ontstekingsreacties te leiden (Pickering,1989).

In de meeste studies naar het gebruik van Percoll bij in-vitro-fertilisatie werd het effect van Percoll op alle eicellen van één patiënt bij één IVF-punctie bestudeerd. De resultaten werden dan vergeleken met een routinematige semenbewerking bij een vergelijkbare groep patiënten.

De resultaten kunnen echter vertekend worden door vele factoren: individuele eicelopbrengst, rijpingsgraad van de eicellen per punctie, semenkwantiteit en -kwaliteit per ejaculaat, IVF-indicatie, kweekomstandigheden per dag op het laboratorium en beoordeling van de kwaliteit van embryo's per patiënt en per laboratoriummedewerker. Vele factoren dus die niet allemaal gedefinieerd kunnen worden in de te vergelijken groepen patiënten, zoals b.v. de eicelkwaliteit. Een goede oplossing hiervoor is het verschil in embryo-kwantiteit en kwaliteit tussen Percoll- en C/O-behandeling per punctie te bekijken. De eicellen dan worden aselekt verdeeld over twee groepen, evenals de zaadcellen.

Twee studies gebruikten deze studie-opzet nl. Bongso (Bongso,1989) en Englert (Englert,1992). Bongso (Bongso,1989) vergeleek de opzwemmethode en een Ficoll-gradiënt als bewerking van het semen. Na uitvoering blijkt 72% van de eicellen die met Ficoll bewerkte zaadcellen geïnsemineerd werden bevrucht te zijn (104 embryo's uit 148 eicellen) tegen 51% van eicellen, die geïnsemineerd werden met de routinematig opgezwoomen zaadcellen (77 embryo's uit 158 eicellen). In dit artikel werden echter geen patiëntenaantallen genoemd.

Englert (Englert,1992) vergeleek de opzwemmethode met Percoll-behandeling in een groep van 60 patiënten, 38 met normale en 22 met abnormale semenparameters. Ook in deze studie is alleen naar het aantal eicellen en embryo's gekeken. Zeer opval-

lend is dat de opbrengst van motiele zaadcellen na Percoll gebruik groter is maar dat het percentage embryo's dat ontstaat in beide groepen gelijk is, zowel bij de normospermie- als bij de oligospermiegroep. Dit in tegenstelling tot wat in vele andere studies beweerd wordt (Guerin,1989; Van der Zwalm,1991). De conclusie van Englert is dat Percoll-gebruik niet leidt tot een hoger bevruchtingspercentage dan de opzwemmethode. Volgens Englert is er geen noodzaak tot Percoll-gebruik in alle patiëntengroepen.

Aan onze studie namen een voldoende aantal patiënten deel om vergelijkingen mogelijk te maken. Zoals blijkt uit Tabel 4.2 hebben patiënten voordeel van de Percollmethode. Zowel bij het totaal aantal patiënten als bij de indicatiegroepen A en D is het resultaat significant beter na Percollgebruik. Van het totaal aantal van 124 patiënten hebben er 33 geen bevruchting met één van beide methoden, er zijn echter 34 patiënten die zonder het gebruik van Percoll waarschijnlijk geen bevruchting zouden hebben. Deze 34 patiënten illustreren de winst die Percoll-gebruik oplevert, de 3 patiënten die niet met Percoll- maar wel met de C/O-methode bevruchting hebben vormen slechts een minderheid.

Voor het totaal aantal eicellen geldt ook dat Percoll een hoger bevruchtingspercentage heeft dan de C/O-methode (Tabel 4.3). Opvallend is echter dat voor de Percoll-indicatiegroepen B en C geen statistisch significant verschil bestaat, ondanks het redelijk groot aantal behandelde eicellen (Tabel 4.3).

Interessant is de vraag of de Percoll-methode een beter resultaat geeft als er met de C/O-methode ook bevruchting ontstaat. Tabel 4.4 laat zien dat er inderdaad een significante verbetering ontstaat in het bevruchtingspercentage met de Percoll-methode, zowel voor de Percoll-indicaties A en C als voor het totaal aantal eicellen. Aangezien de eicellen aselekt verdeeld zijn over beide groepen van zaadcelverwerking, moet het verschil verklaard worden door een zaadcelfactor. Een verklaring zou kunnen zijn dat met Percoll beter geselecteerd kan worden op bevruchtingscapaciteit van de zaadcel of dat Percoll minder schade veroorzaakt aan zaadcellen bij de semenverwerking (Aitken,1989). Deze verklaring kan alleen opgaan als er sprake is van verminderde kwaliteit van het semen zoals waarschijnlijk geldt voor de door ons geselecteerde patiëntengroepen. Als er sprake is van kwalitatief goed semen zou dit niet opgaan (Englert,1992).

Verschillende auteurs beweren dat de zwangerschapsresultaten beter worden na Percoll-gebruik. Zij wijten dit aan de betere kwaliteit van de Percoll-embryo's (Van der Zwalm,1991; Guérin,1989). Uit Tabel 4.6 blijkt dat in onze groep patiënten het verschil niet statistisch significant is. Het aantal patiënten dat echter een transplantatie kreeg van C/O-embryo's is echter klein (n=7). Ook Englert was niet in staat een significant verschil te vinden na transplantatie (Englert,1992).

Wel kan iets gezegd worden over het verschil in kwaliteit tussen de Percoll- en de C/O-embryo's. Kwalitatief goede embryo's worden eerder verkozen voor transplantatie dan kwalitatief minder goede embryo's. Bij patiënten waarbij een keuze tussen Percoll- en C/O-embryo's mogelijk is (n=54), bleek m.b.v. de Tekentoets van Wilcoxon dat voor de ratio "aantal getransplanteerde embryo's/aantal ontstane embryo's" er geen significant verschil bestaat in kwaliteit van Percoll- of C/O-embryo's. Ook Englert komt tot deze conclusie op basis van een morfologische score van kwaliteit van de embryo's en op basis van het aantal ingevroren embryo's (een andere maat voor kwaliteit van embryo's). Voor beide parameters bestond geen verschil tussen Percoll- en C/O-embryo's.

o's. De conclusie van vele auteurs dat een selectie van morfologische betere zaadcellen m.b.v. Percoll ook tot kwalitatief, morfologisch betere embryo's zou leiden kunnen wij dus niet bevestigen.

Ook in onze studie kunnen wij concluderen dat Percoll-gebruik tot een hoger bevruchtingspercentage leidt. Embryo's die via de Percoll-methode ontstaan zijn kwalitatief even goed als embryo's die na een routinematige C/O-methode ontstaan en leiden tot eenzelfde zwangerschapskans. Percoll kan zonder achteruitgang in het bevruchtingspercentage of zwangerschapspercentage voor alle groepen patiënten gebruikt worden.

4.5 REFERENTIES

Aitken RJ. Editorial - the role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl* 1989; 12: 95-97.

Akerlof E, Fredricson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1987; 10: 663-669.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985; 43: 268-273.

Bolton VN, Warren RE, Braude PR. Removal of bacterial contaminants from semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of bouyant density centrifugation. *Fertil Steril* 1986; 46: 128.

Bongso A, Ng S-C, Mok H, Lim MN, Teo HL, Wong PC, Ratnam S. Improved sperm concentration, motility, and fertilization rates following Ficoll treatment of sperm in a human in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1989; 51: 850-854.

Cummins JM, Yanagimachi R. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5: 239-256.

Englert Y, Bergh M van den, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J, Legreve A. Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro-fertilization. *Hum Reprod* 1992; 7: 399-402.

Forster MS, Smith WD, Lee WI, Berger RE, Karp LE, Stenchever MA. Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* 1983; 40: 655-660.

Gellert-Mortimer ST, Clarke GN, Baker HWG, Hyne RV, Johnston WIH. Evaluation of Nyco-denz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril* 1988; 49: 335-341.

Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981; 35: 662-665.

Guérin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. Improvement of survival and ferti-

PERCOLL

lizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum Reprod* 1989; 4: 798-804.

Iizuka R, Kaneko S, Kobanawa K, Kobayashi T. Washing and concentration of human semen by Percoll density gradients and its application to AIH. *Arch Androl* 1988; 20: 117-124.

Katz DF, Mills RN, Pritchett TR. The movement of human spermatozoa in cervical mucus. *J Reprod Fertil* 1978; 53: 259-265.

Lannou D Le, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fert* 1988; 84: 551-556.

Leventhal A, Margalioth EJ, Schenker JG. Testing the fertilizing ability of motile spermatozoa separated by Percoll in patients with abnormal sperm analysis or sperm penetration. *Int J Fertil* 1987; 32: 302-305.

Ng FLN, Liu DY, Baker HWG. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 1992; 7: 261-266.

Pickering SJ, Fleming TP, Braude PR, Bolton VN, Gresham GAG. Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use?. *Fertil Steril* 1989; 51: 1024-1029.

Vermeiden J. Vergelijking semenanalyse voor en na opwerken. In: Slager E, Schoemaker J, Comhaire FH. *Fertiliteitsonderzoek en behandeling anno 1990*. Ciba-Geigy, Zutphen, 1990; 77-85.

Wolf DP, Byrd W, Dandekar P, Quigley MM. Sperm concentration and the fertilization of human eggs in vitro. *Biol Reprod* 1984; 31: 837-848.

Zwalmen P van der, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Human Reprod* 1991; 6: 581-588.

ONTWIKKELING VAN DE MICROMANIPULATIE

5.1 INLEIDING

Micromanipulatie van zaad- en eicellen met als doel behandeling van infertiliteit bij de mens kon pas na het succes van de reageerbuisbevruchting uitgevoerd worden. De micromanipulatietechniek werd echter al eerder toegepast.

Met microchirurgie van levende cellen werd al in de vorige eeuw geëxperimenteerd (Chambers,1940). In de loop van deze eeuw werd microchirurgie ontwikkeld voor de studie van celdifferentiatie en genactiviteit in de cel. Vooral de grotere somatische cellen en gameten zoals die van amfibieën werden bestudeerd. Micromanipulatie van embryo's en eicellen van zoogdieren bleek veel moeilijker te zijn. De dikke zona pellucida en de eicelmembraan zijn zeer elastisch en bezitten een grote weerstand tegen penetratie van microinstrumenten, wat vooral geldt voor onbevruchte eicellen (Lin,1966).

In de jaren '40 gelukte het Nicholas en Hall (Nicholas,1942) om rattenembryo's te manipuleren, in de jaren '50 volgde manipulatie van de humane eicel (Duryee,1954), het embryo van de muis (Tarkowski,1959) en het embryo van het konijn (Seidel,1960).

De eerste studies naar injectie van zaadcellen in eicellen werden uitgevoerd om het bevruchtingsproces beter te kunnen begrijpen, niet om de kans op bevruchting te verhogen.

In de eerste experimenten werden zaadcellen in het cytoplasma van eicellen van de zeeëgel geïnjecteerd (intra-cytoplasmatische injectie) (Hiramoto,1962). Doel bij deze studies was om veranderingen van de zaadcel na injectie in de eicel te bestuderen en om de techniek onder de knie te krijgen om één geselecteerde zaadcel te injecteren. In 1966 probeerden Lin en medewerkers de zaadcel van een muis te injecteren in het cytoplasma van een muize-eicel (Lin,1969). Hoewel zij veel ervaring hadden met de micro-injectie in eicellen en embryo's van niet-zoogdieren, bleek injectie in het cytoplasma van de muis veel moeilijker te zijn.

In de jaren '70 gelukte het Uehara en Yanagimachi (Uehara,1976; Uehara,1977) om de kop van een hamsterzaadcel en van een humane zaadcel in het cytoplasma van een hamstereicel te injecteren. Na injectie decondenseerde de zaadcelkop en een mannelijke pronucleus werd gevormd. Hiermee werd bewezen dat de zaadcelkop zich tot een pronucleus kan omvormen zonder dat de zaadcel het proces van hechting aan de zona tot aan penetratie van het eicelcytoplasma hoeft door te maken. Zaadcellen bleken zowel in eicellen van de eigen species (hamsterzaadcellen in hamstereicellen) als in eicellen van vreemde species (humane zaadcellen in hamstereicellen) te kunnen decondenseren. Als voorwaarde gold dat de eicel rijp moest zijn, eicellen die hun kiemblaas nog bezaten waren niet in staat zaadcellen te laten decondenseren (Usui,1976).

Thadani (Thadani,1980) herhaalde deze studies met de injectie van muizezaadcel-

len in muize-eicellen, hij zag pronucleusontwikkeling en zelfs de eerste mitotische deling van dit embryo.

In 1983 gelukte het Markert (Markert,1983) om muize-eicellen geïnjecteerd met muizezaadcellen te kweken tot levensvatbare embryo's, zelfs tot aan het blastocyststadium. Hij zag ook dat het fenotype van de zaadcel niet bepalend was voor het bevruchtend vermogen na micro-injectie. Zaadcellen met een abnormaal bewegingspatroon of met afwijkende morfologie en zelfs niet-bewegende zaadcellen waren in staat tot pronucleusvorming.

Ook Kraemer (Kraemer,1984), Naish (Naish,1987), Perreault (Perreault,1988), Keefer (Keefer,1989), Hosoi (Hosoi,1988) en Clark (Clark,1988) hebben deze methode bij proefdieren toegepast.

Kraemer (Kraemer,1984) onderzocht de homologe zaadcelinjectie bij runderen en bavianen, hij verkreeg bevruchting en doordelende embryo's.

Naish (Naish,1987) en Perreault (Perreault,1988) injecteerden zaadcellen van de mens, muis, chinchilla, hamster, rat en stier in een hamsteroöcyt. Decondensatie van zaadcellen was bij alle species mogelijk, er bestond echter een verschil in tijd voor decondensatie van zaadcellen van verschillende species. De uit de zaadcellen ontstane pronuclei bleken in staat te zijn tot DNA-synthese, zodat de auteurs concludeerden dat de hamsteroöcyt in staat is op 'templates' afkomstig van verschillende species DNA te synthetiseren.

Een vergelijking tussen de injectie van zaadcelnuclei en de injectie van intacte zaadcellen werd door Keefer (Keefer,1989) gemaakt bij het konijn. Bij beide groepen werden pronucleusvorming en klievingsdelingen van de ontstane embryo's waargenomen.

Ook Hosoi (Hosoi,1988) werkte op dezelfde wijze als Keefer, hij kon de na micro-injectie verkregen embryo's transplanteren naar het oviduct van een draagmoeder; hier ontstonden nakomelingen uit.

Bij al de bovenstaande injectieproeven werden zaadcellen direct in het cytoplasma van het ei geïnjecteerd, wat echter vaak tot degeneratie van het ei leidde. Zo beschrijft Markert (Markert,1983) dat hij embryonale ontwikkeling zag na zaadcelinjectie maar ook dat van de vele honderden eicellen die door hem geïnjecteerd werden de meerderheid degenereerde.

Uehara, Thadani en Markert behandelden daarom de zaadcellen voorafgaand aan de injectie d.m.v. sonicatie (hierbij wordt de zaadcelstaart losgetrild van de zaadcelkop) om de kans op beschadiging van het cytoplasma door een trillende zaadcel te verminderen. Het percentage gedegeneerde eicellen na injectie verminderde hierdoor echter niet. Keefer maakte gebruik van polyvinylpyrrolidon (PVP), een visceuze oplossing die zaadcellen immobiliseert, maar ook dit gaf geen verbetering.

Maximale percentages overleving werden behaald door Perreault (Perreault,1988). Na intracytoplasmatische injectie van hamsterzaadcellen bleef 80 tot 90% van de hamsteroöcyten vitaal. Ook Clarke (Clarke,1988) behaalde een overlevingspercentage van 90% na injectie en 38% van de hamsteroöcyten vertoonde decondensatie na injectie van hamsterzaadcellen. Na de injectie van konijnzaadcellen in konijneneicellen was de overleving maar 50%. Konijnzaadcellen zijn groter dan die van de hamster en de konijneneicel is gevoeliger voor beschadiging dan de hamstereicel.

Aan de toepassing van micro-injectie van zaadcellen in eicellen als behandeling voor infertiliteit werd pas gedacht na de ontwikkeling van de in-vitro-fertilisatie bij de

mens. IVF werd in eerste instantie toegepast indien sprake was van onvruchtbaarheid t.g.v. tubablokkade. Later werd ook aan de behandeling van infertiliteit door andere oorzaken zoals mannelijke infertiliteit gedacht.

Bij het begrip mannelijke infertiliteit wordt verondersteld dat het aantal zaadcellen te laag is, dat hun beweeglijkheid onvoldoende is, dat hun vorm afwijkend is of dat antilichamen de zaadcellen verhinderen om de plaats van bevruchting in de tuba Fallopii te bereiken.

Bij een reageerbuisbevruchting hebben de zaadcellen geen moeite om de eicel te vinden, in een druppel van 350 μ l moet een bewegende zaadcel, zelfs een slecht bewegende, op zijn weg eenmaal de eicel met zijn cumulus ontmoeten. Toch blijkt bij lage aantallen bewegende zaadcellen in het ejaculaat de bevruchtungskans van een eicel bij een reageerbuisbevruchting lager te liggen dan bij een hoger aantal zaadcellen in het ejaculaat (Yovich, 1985).

Wat men vaak ziet in het geval van een inseminatie met een oligozoösperm zaadmonster bij IVF is dat vele zaadcellen aan de zona gehecht zijn, maar dat geen van hen de zona gepasseerd heeft, de perivitelline ruimte geen zaadcellen bevat en pronuclei afwezig zijn.

Een logische stap is dan ook om de passage van de zona voor de zaadcel te vereenvoudigen. De simpelste oplossing is de verwijdering van de zona. Hier bestaan verschillende enzymen voor. Pronase lost de zona van de menselijke eicel en van de muize-eicel op. Trypsine lost de zona van de hamstereicel op. Thadani vond dat zonaloze eicellen na inseminatie met veel lagere aantallen zaadcellen bevrucht konden worden dan eicellen met zona (Thadani, 1982). Veel eicellen werden echter door meerdere zaadcellen bevrucht: polyspermie. Voor een reageerbuisbevruchting is polyspermie niet acceptabel. Triploïde, tetraploïde, etc. embryo's zijn niet levensvatbaar.

De hamstereiceltest is een toepassing van het verwijderen van de zona (Yanagimachi, 1976). Menselijke zaadcellen kunnen na verwijdering van de zona van de hamstereicel, de eicel penetreren en daar decondenseren. De zaadcellen moeten wel in hoge concentratie aanwezig zijn (meer dan één miljoen bewegende zaadcellen/ml) en de penetrerende zaadcellen moeten hun acrosoom verloren hebben. De hamstereiceltest wordt toegepast om het bevruchtend vermogen van het ejaculaat te beoordelen. Studies zijn gaande naar de specificiteit en selectiviteit van deze test.

De zona pellucida heeft verder een belangrijke functie bij het bijhouden van de embryonale cellen tijdens de eerste mitotische delingen. Zonder zona raken de embryonale cellen hun samenhang kwijt (Modlinskij, 1970; Trounson, 1974).

Om polyspermie te vermijden en om de steunende functie van de zona te behouden is het nodig een compromis te vinden tussen totale lysis van de zona en een intacte maar onpenetereerbare zona.

Verschillende onderzoekers zijn verder gegaan met de ontwikkeling van de intracytoplasmatische injectie, andere onderzoekers hebben naar alternatieven gezocht die mogelijk minder schade aan de eicel geven en succesvoller kunnen zijn. Hieronder zal geprobeerd worden de verschillende vormen van micro-manipulatie te beschrijven, samen met de naamgeving die de onderzoekers voor hun techniek bedacht hebben.

5.2 De intracytoplasmatische zaadcelinjectie.

Lanzendorf (Lanzendorf,1988) heeft de intracytoplasmatische injectie toegepast bij de mens. Zij immobiliseerde de zaadcellen door ze in te vriezen bij -70°C in PBS (Phosphate Buffered Saline) en ze daarna op te lossen in het stroperige polyvinylpyrrolidon (PVP). Zij injecteerde 20 humane eicellen. Na injectie degenereerden er 8 eicellen, 9 eicellen werden zodanig geactiveerd dat zij de tweede meiotische deling voltooiden, en 5 van deze 9 eicellen vertoonden 13 uur na injectie twee pronuclei. Deze embryo's werden niet getransplanteerd.

Martin (Martin,1988) heeft de chromosomale constitutie van humane zaadcellen na een intensieve voorbehandeling en intracytoplasmatische injectie in hamstereicellen bestudeerd. Van twee gezonde donoren werd het semen na menging met overmaat medium gecentrifugeerd. Het supernatant werd gedecanteerd en een laagje medium achtergelaten op de pellet waarin de zaadcellen konden opzwemmen. Een deel van de opgezwommen zaadcellen onderging daarna een sonicatie, waarbij staart en acrosomale membraan losgetrild worden van de kop, een ander deel werd opgeslagen in een TEST-eigeel buffer bij 4°C . Per eicel werden 2 zaadcellen geïnjecteerd, per 100 behandelde eicellen konden slechts 3 tot 4 humane zaadcelkaryotyperingen verricht worden. Na sonicatie en micro-injectie had 9% van de zaadcellen een normaal karyotype, na bevriezing in de TEST-eigeel buffer had 58% een normaal karyotype. Na een normale hamstereiceltest worden bij 23% van de gepenetreerde zaadcellen chromosomale afwijkingen gevonden (Martin,1987).

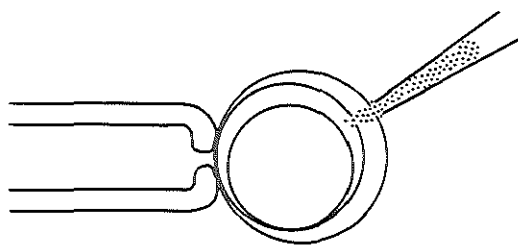
De experimenten van Martin laten dus zien dat sonicatie en afkoelen van zaadcellen schade toebrengt aan het genoom van de zaadcel. Zij kon met deze experimenten echter niet bewijzen dat het intracytoplasmatisch injecteren verantwoordelijk is voor de chromosomale afwijkingen.

5.3 ZONA-INCISIE, ZONACRACKING EN ZONAPERFORATIE.

Bij deze technieken wordt de zona doorkliefd met een afgesloten zeer scherpe glazen pipet (zona-incisie) en opengebrouwen (zonacracking) of wordt de zona voor een klein deel opgelost door lokale toediening van een enzymatische of zure oplossing (zonaperforatie). Het gebruik van de enzymatische zona-opening wordt ook wel zonadrilling genoemd. Bij al deze behandelingen wordt de eicel gefixeerd aan een micropipet door de eicel aan deze pipet vast te zuigen.

Na de opening van de zona wordt de eicel gedeponneerd in een druppel medium met daarin een bepaalde concentratie mobiele zaadcellen. De zaadcellen moeten zelf de opening in de zona zien te vinden en hierdoor naar binnen zwemmen. Eenmaal in de perivitelline ruimte aangekomen moeten zaadcelmembraan en oölemma fuseren, waarna de bevruchting voltooid wordt.

Een van de eersten die zonaperforatie (zonadrilling) als een techniek voor bevruchtingsondersteuning bestudeerde was Gordon (Gordon,1986). Hij maakte gebruik van een zure Tyrode-oplossing, met een pH van 2.0, die de zonale glycoproteïenlaag kan oplossen (Nicholson,1975). Een kleine pipet gevuld met Tyrode-oplossing wordt vlak voor de zona geplaatst, de zure oplossing wordt uitgespoten, de zona verdunt zich eerst op de plaats van toediening, zwelt dan op en barst open (zie figuur 5.1).



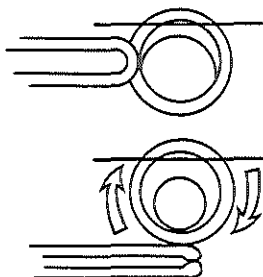
Figuur 5.1 Zona-perforatie of zona-drilling: met een smalle pipet wordt een zure Tyrode-oplossing tegen de zona pellucida gespoten.

Gordon experimenteerde met muizen. Na de zonaperforatie plaatste hij ongeveer 30 eicellen in druppels van 30 μ l met een concentratie van 10^4 zaadcellen/ml. Hij vond een bevruchtingspercentage van 15%. Dit was significant hoger dan het bevruchtingspercentage van 0% indien 30 eicellen met intacte zona in een druppel met 10^4 zaadcellen/ml werden geplaatst. Toch is het bevruchtingspercentage van 15% na zonaperforatie lager dan het bevruchtingspercentage van bijna 100% bij een in vivo bevruchting in het oviduct waar de eicel:zaadcel ratio 1:1 is.

Gordon keek ook naar het percentage polyspermie na zonaperforatie. Bij een concentratie van 10^4 zaadcellen/ml kwam polyspermie niet voor. Bij een concentratie van 10^6 zaadcellen/ml was 2% van alle bevruchte eicellen door twee of meer zaadcellen bevrucht. Bij de controlegroep eicellen die in-vitro-inseminatie onderging was het polyspermiepercentage 1%.

Depypere vond een polyspermiepercentage van 7% na zonaperforatie, versus 3% voor controle-eicellen (Depypere, 1988). Hij vergeleek in zijn studie bij de muis zonaperforatie m.b.v een zure Tyrode-oplossing met zona-incisie.

Het was Tsunoda die de zona-incisie ontwikkelde (Tsunoda, 1986). Bij zona-incisie wordt de eicel eerst met een fixatiepipet vastgezogen, daarop wordt een zeer dunne glazen pipet door de zona pellucida geduwd tot in de perivitelline ruimte. Deze pipet wordt doorgeschoven langs de eicel tot de zona aan de andere kant wordt geopend. De aanzuigkracht van de fixatiepipet wordt vermindert en de eicel zit als het ware gespiest aan de injectiepipet. Door de eicel langs de zijkant van de fixatiepipet heen en weer te bewegen ontstaat een sleuf in de zona. De eicel wordt daarna in een druppel zaadcellen geplaatst (zie figuur 5.2).

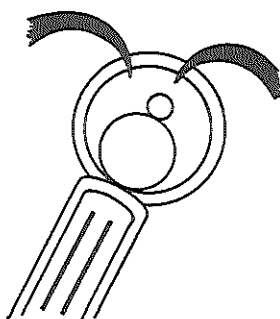


Figuur 5.2 Zona-incisie: De eicel wordt aan een smalle pipet gespiest, door het heen en weer bewegen van de eicel langs de fixatiepipet wordt een sleuf in de zona pellucida gemaakt.

Depypere vond bij een inseminatieconcentratie van 2×10^6 zaadcellen/ml een bevruchtingspercentage van 90% bij zowel de controle (onbehandelde) eicellen, bij zonaperforatie en bij zona-incisie. Bij afnemende concentraties zaadcellen nam het bevruchtingspercentage bij de controlegroep het meest af, gevolgd door de zona-incisie groep, na zonaperforatie nam het bevruchtingspercentage het minst af. Bij een concentratie van 2×10^4 zaadcellen/ml werd 5% van de controle eicellen bevrucht, 28% na zonaincisie en 70% na zonaperforatie.

De lagere bevruchtingspercentages na zona-incisie in vergelijking tot die na zonaperforatie worden waarschijnlijk veroorzaakt door de snelle sluiting van de zona na zona-incisie. De elastische glycoproteïnelaag van de zona sluit zich namelijk snel na een mechanische beschadiging.

Een andere methode om de zona te openen is de zgn. zonacracking. Met twee micropipetten in de vorm van twee haakjes wordt de zona na fixatie van de eikel opengetrokken (zie figuur 5.3). Odawara en Lopata (Odawara,1989) hebben deze techniek toegepast bij de muis. Om beschadiging van de eikel te voorkomen werd de techniek uitgevoerd in een hyperosmolaire oplossing van 440 Mosmol/kg, de eikel krimpt daarbij zodat de haakjes minder gemakkelijk de eikel zullen raken. Zij vonden een hoger bevruchtingspercentage dan Depypere na zona-incisie. Bij een zaadcelconcentratie van 10^4 zaadcellen/ml werd een bevruchtingspercentage van 63% gezien en bij een concentratie van 10^3 /ml een bevruchtingspercentage van 13%.



Figuur 5.3 Zona cracking: met behulp van twee haakjes wordt de zona pellucida opengebroken.

Embryo's van proefdieren die ontstonden na de verschillende vormen van zona-opening die hierboven beschreven zijn, werden ook getransplanteerd naar draagmoeders. Gordon transplanteerde 79 zonaperforatie-embryo's, hieruit ontstonden 29 nakomelingen (36%) (Gordon,1986), Depypere transplanteerde 100 zona-incisie-embryo's (Depypere,1988), 43 nakomelingen werden geboren (43%). Odawara transplanteerde 40 zonacracking-embryo's, 14 nakomelingen (35%) werden geboren (Odawara,1989). Met al deze methoden van zona-opening is het dus mogelijk eicellen te bevruchten, embryo's te kweken en te transplanteren waarna in voldoende mate nakomelingen geboren worden.

Behalve voor het verhogen van het bevruchtingspercentage is zona-opening, evenals de intra-cytoplasmatische injectie, gebruikt voor de bestudering van het bevruchtingsproces.

Cummins (Cummins,1989) kon 30 minuten na zona-incisie en zonaperforatie

acrosoomvrije zaadcellen aantonen in het oöplasma. Bij de eicellen die geen zonaperforatie ondergaan hadden kon hij pas na één uur, één zaadcel zonder acrosoom in de zona te vinden en bevonden zich vele zaadcellen met acrosoom op de buitenkant van de zona. Aangezien zaadcellen voorafgaand aan de bevruchting eerst aan de zona moeten hechten en dan pas de acrosoomreactie ondergaan, is het waarschijnlijk dat de eicellen die zonaperforatie ondergaan hadden, door zaadcellen bevrucht waren die hun acrosoom spontaan verloren hadden.

Ahmad en Gwatkins (Ahmad,1989) verrichtten een studie naar de bevruchting van muizen met een specifieke mutatie die steriliteit tot gevolg heeft. Mannelijke muizen met genotype *tt* zijn steriel, ze produceren wel zaadcellen maar deze zijn niet bewegend. *Tt* mannetjes kunnen wel *in vivo* eicellen bevruchten maar niet *in vitro*. *Tt* muizen overlijden al *in utero*. Zaadcellen van *Tt* en *tt* mannetjesmuizen konden bij de experimenten van Ahmad *in-vitro* geen eicellen bevruchten, zaadcellen van *Tt* mannetjes werden wel op de zona aangetroffen. Na zonaperforatie konden zaadcellen van *tt* mannetjes nog steeds geen eicellen bevruchten. Zaadcellen van *Tt* mannetjes echter wel, door de zonaperforatie werd hun *in-vitro* infertiliteit opgeheven. Overigens bepaalt niet de genetische inhoud van de zaadcel het bevruchtend vermogen. Deze draagt tenslotte een *t* of *T* allel. Het genoom van de mannetjesmuis, *tt* of *Tt*, bepaalt de rijpingsgraad van de zaadcellen (zowel de *t* of *T* allel dragers) in de testis en epididymis. Zaadcellen van *tt* en *Tt* mannetjes muizen zijn onvoldoende gerijpt om eicellen *in-vitro* te bevruchten. Deze muizestam zou dus model kunnen staan voor bepaalde vormen van infertiliteit.

Dezelfde groep onderzoekers heeft ook de bevruchting van muize-eicellen na behandeling met een monoclonaal antilichaam gericht tegen het zona glycoproteïne ZP3 bestudeerd (Conover,1988). Bij de controle-eicellen werd 62% van de eicellen *in-vitro* bevrucht met een concentratie van 10^6 zaadcellen/ml. Na incubatie van eicellen met het anti-ZP3, bonden zaadcellen nog wel aspecifiek aan de zona, maar werd slechts 2% van de eicellen bevrucht. Na behandeling met het anti-ZP3 en microperforatie werd 65% van de eicellen bevrucht. Een direct bewijs dat de bevruchtende zaadcellen door de opening in de zona gezwommen waren.

Nadat de resultaten van de bovenstaande proefdierexperimenten bekend werden, begonnen enkele onderzoekers met toepassing van de zonaperforatie en zona-incisie bij infertiele paren. Omdat al deze onderzoekers hun eigen methode voor zonaperforatie of -incisie gebruikten en zij niet dezelfde parameters beschreven hebben, is een vergelijking tussen deze studies moeilijk te maken.

Gordon (Gordon,1988) gebruikte de techniek van zonaperforatie m.b.v. een zure oplossing. Van de 47 eicellen die hij gebruikte degenereerden er 16, van de 31 overgebleven eicellen werden er 10 bevrucht, 5 van de 10 vertoonden polyspermie, van de 5 embryo's kwamen er slechts drie voor transplantatie in aanmerking.

Malter (Malter,1989) paste de zona-incisiemethode toe, hij kon door het heen en weer bewegen van de injectiepipet waaraan de eicel gespiest was een kapje van de zona verwijderen. Hij behaalde een goed bevruchtingspercentage en een lage graad van polyspermie (zie tabel 5.1). Evenals Gordon maakte hij een vergelijking met controle *in-vitro*-inseminatie. Opvallend is dat IVF in zijn studie ook zeer goed scoort, 22 van de 30 eicellen werden bevrucht na een routine IVF.

Ook Depypere (Depypere,1990) heeft evenals Gordon zijn techniek eerst op de muis geprobeerd. Daarna paste hij deze methode toe bij patiënten. Hij verrichte bij 19

patiënten een embryotransfer, met gemiddeld 2,4 embryo's (totaal 44, zie tabel 5.1) per transfer. Hieruit ontstonden geen zwangerschappen.

TABEL 5.1: Resultaten na verschillende methoden van zonaopening bij de mens

| Onderzoeker | Techniek | # eicellen | | | | |
|-------------|----------|------------|------------|----------|--------------|-------------------|
| | | Behandeld | Overleving | Bevrucht | Poly-spermie | Getrans-plantéerd |
| Gordon | drilling | 47 | 31 | 10 | 5 | 3 |
| Malter | incisie | 35 | 34 | 31 | 4 | 23 |
| Depypere | drilling | 238 | 159 | 58 | 1 | 44 |

Belangrijke problemen die in deze studies met humane eicellen naar voren komen zijn het hoge percentage polyspermie en de degeneratie van veel eicellen, vooral na zonadrilling. Ng die ook met zonadrilling werkte maar de zaadcellen daarna in de perivitelline ruimte insemineerde, voert aan dat de zure oplossing kan interfereren met het vervolg van de tweede meiotische deling van de eicel en uiteindelijk kan leiden tot degeneratie van de eicel (Ng,1989). Met elektronenmicroscopische opnames van de met een zure oplossing behandelde eicellen bleek dat de eicel in de buurt van de zona-opening slechts weinig celorganellen en corticale granula bevatte. Dit werd onder het onbehandelde deel van de zona bij deze eicellen en bij eicellen die in het geheel niet behandeld werden nooit gezien.

Ook implanteerden de na zonadrilling ontstane embryo's nooit, wat kan wijzen op schade van het cytoplasma van de eicel. Een onbeschadigd eicelcytoplasma is essentieel voor de vroeg embryonale ontwikkeling (Pederson,1988). Bij de rat werd ook een verminderde implantatiekans gevonden van embryo's die na zonadrilling ontstaan waren (Vanderhyden, 1989).

In 1992 werden door Van Steirteghem de resultaten van zona-incisie en -perforatie van de afgelopen twee jaar verzameld (Steirteghem,1992). Hij gebruikt de verzamelterm partiële zonadissectie voor al deze technieken. Alle auteurs gebruikten mechanische technieken om de zona te openen, d.w.z zona-incisie en zonacracking. De resultaten staan vermeld in tabel 5.2.

TABEL 5.2: Resultaten zona-incisie bij de mens als verzameld door Van Steirteghem (Steirteghem,1992)

| Onderzoeker | # cycli met zonaincisie | # cycli met transplantatie (%) | # zwangerschappen (%) |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Imoedemhe | 23 | 6 (26%) | 1 (4%) |
| Laufers | 39 | 20 (51%) | 1 (3%) |
| Malter | 57 | 38 (67%) | 12 (21%) |
| Van der Zwalmen | 32 | 15 (47%) | 2 (6%) |
| Veiga | 138 | 27 (20%) | 4 (3%) |

Zoals uit tabel 5.2 blijkt behalen de diverse onderzoekers zeer verschillende resultaten met hun behandeling. Een belangrijk punt van verschil tussen de auteurs is de selec-

tie van patiënten. Patiënten die met een routine IVF-behandeling een goede kans maken zullen m.b.v. zonaincisie ook tot bevruchting komen. Om een goed oordeel over de effectiviteit van zona-opening te kunnen maken moeten de auteurs hun criteria voor toelating vermelden, dit is niet in alle publikaties het geval.

5.4 SUBZONALE MICRO-INJECTIE OF MICROMANIPULATIE.

Bij deze techniek wordt de eicel vastgehouden met een fixatiepipet. De injectiepipet, een smalle pipet met een opening om een zaadcel te kunnen opzuigen en uitblazen, en met een scherpe punt, wordt door de zona geprikt totdat hij in de perivitelline ruimte komt. In de perivitelline ruimte worden één of meer zaadcellen uitgeblazen en de injectiepipet wordt teruggetrokken met achterlating van de zaadcellen in de perivitelline ruimte. Deze techniek vergt meer kundigheid dan de eerder genoemde technieken en is daarom pas later tot ontwikkeling gekomen. Ook met deze methode zijn zowel dierexperimentele als humane studies verricht. Omdat in dit proefschrift deze methode van micro-manipulatie gebruikt wordt zullen in de volgende hoofdstukken een nadere beschrijving van deze techniek, de over dit onderwerp bekende literatuur en de resultaten van onze experimenten beschreven worden.

5.5 REFERENTIES

Ahmad T, Conover JC, Quigley MM, Collins RL, Thomas AJ, Gwatkin RB. Failure of spermatozoa from T/t mice to fertilize in vitro is overcome by zona drilling. *Gam Res* 1989; 22: 369-373.

Chambers R. The micromanipulation of living cell. In: Moutlon FR (ed). *The cell and protoplasm*. The Science Press, Washington DC, 1940; 20-30.

Clarke RM, Rexroad CE, Powell AM, Johnson LA. Microinjection of ram spermatozoa into homologous and heterologous oocytes. *Biol Reprod* 1988; 38, supplement 1: Abstract 79.

Conover JC, Gwatkin RB. Fertilization of zona-drilled mouse oocytes treated with a monoclonal antibody for the zona glycoprotein, ZP3. *J Exp Zool* 1988; 113-118.

Cummins JM, Edirisinghe WR, Odawara Y, Wales RG, Yovich JL. Ultrastructural observations on gamete interactions using micromanipulated mouse oocytes. *Gam Res* 1989; 24: 461-469.

Depypere HT, McLaughlin KJ, Seemark RF, Warnes GM, Matthews CD. Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod Fert* 1988; 84: 205-211.

Depypere H. De rol van de zona pellucida bij geassisteerde fertilisatie door middel van micromanipulatie. Thesis. Rijksuniversiteit Gent, 1990.

Duryee WR. Microdissection studies on human ovarian eggs. *Trans N Y Acad Sci* 1954; 17: 103-108.

Gordon JW, Talansky BE. Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correc-

tion of oligospermia. J Exp Zool 1986; 239: 347-354.

Gordon JW, Grunfeld L, Garnisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. Fertil Steril 1988; 50: 68-73.

Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. Exp Cell Res 1962; 27: 416-426.

Hosoi Y, Miyah M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 1988; Abstract 331.

Keefer CL. Fertilization by sperm injection in the rabbit. Gam Res 1989; 22: 59-69.

Kraemer DC. Contributions of mammalian embryo transfer to developmental genetics. Am J Med Genet 1984; 18: 643-648.

Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Musser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evolution of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril 1988; 49: 835-842.

Lin TP. Microinjection of mouse eggs. Science 1966; 151: 333-337.

Lin TP. Development of a microsurgical procedure for delivery of mouse sperm into unfertilized eggs. Soc Study of Reprod, Sec Ann Meeting 1969; Abstracts, no 38, p 19.

Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril 1989; 51: 139-148.

Markert CL. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. J Exp Zool 1983; 228: 195-206.

Martin RH, Rademaker AW. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal man. Am J Human Genet 1987; 41: 482-492.

Martin RH, Ko E, Rademaker A. Human sperm chromosome complements after microinjection of hamster eggs. J Reprod Fertil 1988; 84: 179-186.

Modlinski J. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. J Embryol Exp Morph 1970; 23: 539-547.

Naish SJ, Perreault SD, Zirkin BR. DNA synthesis following microinjection of heterologous sperm and somatic cell nuclei into hamster oocytes. Gam Res 1987; 18: 109-120.

Ng S-C, Bongso A, Chang S-I, Sathananthan H, Ratnam S. Transfer of human sperm into the perivitelline space of human oocytes after zona-drilling or zona-puncture. Fertil Steril 1989; 52: 73-78.

Nicholas JS, Hall BV. Experiments on developing rats. II. The development of isolated bla-

stomeres and fused eggs. *J Exp Zool* 1942; 90: 441-458.

Nicholson GL, Yanagimachi R, Yanagimachi H. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zona pellucida and plasmamembranes of mammalian eggs. *J Cell Biol* 1975; 66: 263-274.

Odawara Y, Lopata A. A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentrations: a mouse model. *Fertil Steril* 1989; 51: 699-704.

Pederson R. Early mammalian embryogenesis. In: Knobil E, Neill J (eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1988; 187-230.

Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988; 39: 157-167.

Seidel F. Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens *Onychotolagus ciniculus*. *Arch f Entwicklungsmech* 1960; 152: 43-130.

Steirteghem A van, Palermo G. Questions arising from assisted fertilization. *TFO* 1992; 6: 38-40.

Tarkowski AK. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Acta Theriol* 1959; 3: 191-267.

Thadani YM. A study of heterospecific sperm-egg interactions in the rat, mouse and deer-mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J Exp Zool* 1980; 212: 435-453.

Thadani YM. Mice produced from eggs fertilized in vitro at a very low sperm:egg ratio. *J Exp Zool* 1982; 219: 277-283.

Trounson A, Moore N. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1974; 41: 97-105.

Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K, Uchida T, Sugie T. Effects of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 1986; 240: 119-125.

Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; 15: 467-470.

Uehara T, Yanagimachi R. Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol Reprod* 1977; 16: 315-321.

Usui N, Yanagimachi R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J Ultrastruc Res* 1976; 57: 276-288.

Vanderhyden B, McLaughlin K, Ruthledge J, Armstrong D. Using zona drilling to increase the penetrability of rat oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 1989.

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers B. The use of zona free ova as a test for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 1976; 15: 471-476.

Yovich JL, Stanger JD, Yovich JM. The mangement of oligospermic infertility by in vitro fertilization. Ann N Y Acad Sci 1985; 442: 293-300.

SUBZONALE INSEMINATIE: LITERATUUROVERZICHT

Uit de intracytoplasmatische injectie van DNA en celorganellen heeft zich de subzonale injectietechniek ontwikkeld. Onderzoekers die zaadcellen of zaadcelkoppen in de eicel injecteerden bemerkten al snel dat dit veelal gepaard ging met lysis van de eicel. De grote diameter van de injectiepipet die nodig is om de zaadcel te transporteren geeft een ware doodsteek aan de oöcyt (Markert,1983; Lanzendorf,1988). Zowel de oöcyt van de muis als die van de mens degenereert zeer snel na de injectie, nl. binnen 5 minuten (eigen waarneming).

Een alternatief is injectie in de perivitelline ruimte. Op deze manier is het aantal zaadcellen dat de eicel mag bevruchten vast te stellen en kan de interactie tussen zaadcel en eicelmembraan bestudeerd worden.

De eerste onderzoeker die melding maakt van het gebruik van de subzonale inseminatie was Metka uit Wenen (Metka,1985). Hij vermeldt experimenten bij verschillende diersoorten uitgevoerd te hebben alvorens te starten met een behandeling van drie patiëntenparen. Drie eicellen van ieder paar werden gebruikt voor de injectie. Eén paar had reeds 3 maal een IVF-poging ondergaan, steeds zonder bevruchting. Bij de twee andere paren was met zaad van de man een hamstereiceltest verricht, beide met negatief resultaat. Per eicel werd één zaadcel geïnjecteerd in de perivitelline ruimte. Pas na 48 uur vond de eerste inspectie van de gemanipuleerde eicellen plaats. Eén van de negen eicellen had één pronucleus, één eicel bevond zich in het viercellig stadium en de 7 overige eicellen bleven onveranderd. Geen enkele eicel werd beschadigd. Metka vermeldt niet of de eicellen die op de routine IVF-wijze werden geïnsemineerd, bevrucht waren.

De meeste onderzoekers begonnen, voorafgaand aan de behandeling van humane eicellen, met proefnemingen op een diersmodel. Het meest bruikbaar hiervoor is de muis. Een kleine diersoort, de huisvesting vergt weinig plaats, de mogelijkheid van een korte stimulatie met gonadotrofinen en een grote eicelopbrengst (ongeveer 30 rijpe eicellen per gestimuleerde muis). Muize-eicellen en zaadcellen kunnen verder goed gebruikt worden voor een in-vitro-fertilisatie, de embryo's zijn goed te kweken onder dezelfde omstandigheden als humane eicellen en na transplantatie van de embryo's naar draagmoeders ontwikkelden zich voldoende aantallen levende nakomelingen.

Daarom startten Barg et al (Barg,1986) met micro-inseminatie bij de muis. Zaadcellen werden in deze studie eerst immobiel gemaakt voordat ze gebruikt werden voor een subzonale inseminatie. Dit geschiedde door het toevoegen van de calciumionofor A23187 aan het medium. Behalve immobilisatie induceert deze stof ook de acrosoomreactie. Andere methoden die zij gebruikten voor immobilisatie van het zaad waren een incubatie bij 4°C gedurende 12 uur, toevoeging van 10 mM EDTA aan het medium gedurende 1 uur of mechanische beschadiging van de zaadcelstaart met de

micro-injectienaald. De zaadcellen die op deze manier waren voorbehandeld, bleken na subzonale inseminatie niet in staat te zijn om de eicel te bevruchten.

Na injectie in het cytoplasma konden echter in enkele overlevende eicellen wel mannelijke pronuclei gevonden worden (de meeste eicellen degenereerden na de intracytoplasmatische injectie). De onderzoekers concludeerden dat motiliteit van de zaadcel bij de muis essentieel is voor het deel van de bevruchting waarbij oölemma en zaadcelmembraan moeten samensmelten.

Mann van de Monash Universiteit in Clayton, Australië, gebruikte mobiele zaadcellen voor de subzonale injectie (Mann, 1988). Hij was de eerste die de geboorte van muizen beschreef na gebruik van de subzonale microinjectie. De injectie van één gecapaciteerde zaadcel per rijpe eicel leidde in 25% van de gevallen tot bevruchting, d.w.z. een eicel met twee pronuclei en met een tweede poollichaampje (55 van de 221 eicellen werden bevrucht). Van de 55 bevruchte eicellen werden er 48 getransplanteerd naar het oviduct van een draagmoeder. Hieruit ontwikkelden zich 26 nakomelingen, alle waren gezond.

In een volgende studie in dit centrum werd gepoogd het bevruchtingspercentage te verhogen door het percentage acrosoomvrije zaadcellen te verhogen (Lacham, 1989). Door de zaadcellen voorafgaand aan de subzonale inseminatie langdurig te incuberen in medium liep het percentage acrosoomvrije zaadcellen op van 7% op tijdstip 0 tot 52% na 6 uur. Als de zaadcellen na 90 minuten incubatie in medium overgezet werden in een oplossing met 12 mM dbc-GMP en 10 mM imidazole ter stimulering van de acrosoomreactie was het percentage acrosoomvrije zaadcellen 58%.

Na incubatie van de zaadcellen met dbc-GMP en imidazole, werd 43% van de eicellen bevrucht na subzonale inseminatie. Dit bleek geen significante stijging van het bevruchtingspercentage te zijn t.o.v. inseminatie met in medium (gedurende twee uur) geïncubeerde zaadcellen (bevruchtingspercentage van 36%).

Yamada voerde bij de muis ook een subzonale inseminatie uit na eerst de acrosoomreactie geïnduceerd te hebben (Yamada, 1988). Twintig minuten na incubatie in een medium met 12 mM dbc-GMP en 10 mM imidazol vond hij 93% acrosoomvrije zaadcellen. De bevruchtingspercentages na subzonale inseminatie bedroegen 5% voor onbehandelde zaadcellen en 19% voor behandelde zaadcellen. Hoewel de bevruchtingspercentages bij dit onderzoek wel significant verschilden, werd bij een maximale acrosoomreactie nog maar 20% van de eicellen bevrucht.

Behalve de acrosoomreactie spelen dus meer factoren een rol bij het bevruchtend vermogen van de zaadcel.

Het bevruchtend vermogen van menselijke zaadcellen na subzonale injectie in een hamstereicel werd getest door Lassalle en Testart (Lassalle, 1987). Zij injecteerden verschillende aantallen zaadcellen van bewezen vruchtbare donoren onder de zona pellucida van hamstereicellen. Uit de resultaten bleek dat de injectie van 5 tot 12 zaadcellen het meest succesvol was, 26% van de oöcyten werd door de zaadcellen gepenetreerd, de helft van de oöcyten werd hierbij echter door meer dan één zaadcel gepenetreerd. Werden meer dan 12 zaadcellen geïnjecteerd dan werd maar 5% van de eicellen gepenetreerd, die bovendien alle polyspermie vertoonden. Na de injectie van minder dan 4 zaadcellen werd 6% van de eicellen gepenetreerd en ontstond geen polyspermie.

In een vervollexperiment, uitgevoerd door Lassalle en Testart, werden de zaadcellen voorbehandeld of m.b.v. de calciumionofoor A23187 of d.m.v. invriezen en ont-

dooien van semen (Lassalle,1988). Daarop werden verschillende aantallen zaadcellen in de perivitelline ruimte van de hamstereicellen geïnjecteerd. Hierna bleek dat de injectie van 1 zaadcel na de ionofoor of na de invries/ontdooi-behandeling in respectievelijk 18% en 27% van de eicellen leidde tot de vorming van een gedecondenseerde zaadcel. Bij de injectie van 5 zaadcellen liepen de percentages op tot respectievelijk 57% en 71%. Bij de groep onbehandelde zaadcellen was het hoogst behaalde percentage eicellen met decondensatie 16%. Het percentage polyspermie liep op bij hogere aantallen geïnjecteerde zaadcellen maar was niet evenredig met het aantal geïnjecteerde zaadcellen. Lassalle en Testart concludeerden hieruit dat de eicel het aantal zaadcellen dat penetreert en decondenseert bepaalt, ook als er meerdere geschikte zaadcellen zijn.

Voorafgaand aan de experimenten met muizen (Mann,1988) was er aan de Monash Universiteit in de groep van Mann en Trounson reeds onderzoek verricht naar de mogelijkheid van bevruchting van humane eicellen na subzonale injectie met humane zaadcellen (Laws-King,1987).

Het semen werd gewassen op een Percoll-gradiënt, de zaadcellen werden daarop 20 tot 24 uur bewaard in medium waarbij CaCl_2 werd vervangen door SrCl_2 . Twee uur voor de micro-inseminatie werden de zaadcellen overgezet in CaCl_2 -rijk medium. Deze behandeling leidt tot een inductie van de acrosoomreactie (Mortimer,1986). Van de zeven eicellen die geïnjecteerd werden met één zaadcel waren er vijf met twee pronuclei en met een tweede poollichaampje. Injectie van drie eicellen met één onbehandelde zaadcel resulteerde niet in bevruchting. Conclusie van de auteurs was dat micro-injectie zinvol kan zijn bij de behandeling van een oligo-asthenozoöpermie. Onduidelijk is of in deze studie zaadcellen van vruchtbare of onvruchtbare mannen gebruikt zijn.

De auteurs kondigen in dit artikel een vervolgonderzoek aan. Zij willen eerst de chromosomale inhoud van de op deze wijze ontstane embryo's onderzoeken voordat tot transplantatie van deze embryo's wordt overgegaan. Zij vragen zich af of selectie van geïnjecteerde en bevruchtende zaadcellen door de onderzoeker een vergrote kans geeft op het ontstaan van abnormale nakomelingen. Bovendien eiste de medisch-ethische commissie van de Australische deelstaat Victoria (waar de Monash Universiteit gelegen is) dat eerst een aantal embryo's chromosomaal onderzocht werd, voordat embryo's getransplanteerd mochten worden.

Voordat dit vervolgonderzoek gepubliceerd kon worden, werd de eerste zwangerschap na subzonale inseminatie beschreven door Ng (Ng,1988). Vijf eicellen van een patiënte werden geïnjecteerd met zeven tot tien bewegende zaadcellen van haar partner, een patiënt met een oligo-asthenozoöpermie. Eén eicel werd bevrucht en getransplanteerd. Hieruit ontstond een zwangerschap. Ook een tweede zwangerschap werd door deze groep beschreven (Sathananthan,1989).

Na injectie van onbeweeglijke zaadcellen van een lijder aan het 'immotiel cilia syndroom' (syndroom van Kartagener) (Palmlblad,1984) in de eicellen van zijn partner kon de onderzoeksgroep van Ng een bevruchting bewerkstelligen. Drie van de vijf eicellen werden bevrucht na subzonale inseminatie (Bongso,1989).

Bij deze behandelingen in Singapore, waaraan ook enkele onderzoekers van de Monash Universiteit te Clayton deelnamen, werden zaadcellen steeds in een SrCl_2 -bevattend medium gepreïncubeerd.

Het verslag van de studie naar chromosomale afwijkingen van micro-inseminatie

embryo's volgde in 1990 (Kola,1990). Het zaad van 20 andrologische patiënten werd gebruikt voor een subzonale inseminatie van 260 donoroöcyten. Van de 20 patiënten waren er 9 patiënten waarbij de zaadcellen één of meerdere oöcyten bevrucht hadden. Van de 260 eicellen werden er 23 (9%) bevrucht. Van deze 23 konden er 18 succesvol gekaryotypeerd worden. Als controlegroep werden 30 embryo's van paren gebruikt die op een routine IVF-wijze (in-vitro-inseminatie) verkregen waren.

Van de 18 embryo's waren er 4 (22%) aneuploid, van de 30 controle embryo's waren er 9 (30%) aneuploid, bij beide groepen werden geen structurele afwijkingen gevonden. Zoals Kola zegt is dit verschil statistisch niet significant. Om te bewijzen dat het verschil niet significant blijft, moeten vele honderden embryo's onderzocht worden. Dit is natuurlijk geen reëel onderzoek i.v.m. het grote aantal patiënten dat hiervoor behandeld zou moeten worden zonder dat zij kans op een zwangerschap hebben.

Een van de eerste uitgebreide studies naar het resultaat van subzonale inseminatie bij de mens werd door Fishel gepubliceerd (Fishel,1990). Van de 369 oöcyten die subzonaal geïnjecteerd werden, werden er 55 bevrucht (15%). Deze embryo's werden ook getranplanteerd. Van de 85 patiëntenparen waren er 31 die tot aan een transplantatie van een gemicro-injecteerd embryo kwamen (36%), hieruit ontstonden 3 zwangerschappen (3,5%).

In snel tempo verschenen hierna vele studies over het gebruik van subzonale inseminatie bij de mens. Deze studies zijn verzameld door van Steirteghem (Steirteghem,1992) en door Laufer (Laufer,1992). Een opsomming van alle tot nu toe bekende studies volgt in Tabel 6.1. Een beschrijving van verschillende van deze studies vindt plaats in hoofdstuk 8 'Micro-inseminatie bij de mens: een controlestudie in-vitro-inseminatie versus micro-inseminatie'.

TABEL 6.1: Resultaten van subzonale inseminatie bij verschillende onderzoekers.

| Onderzoeker | Cycli Aantal | Transplantaties | | Zwangerschappen | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | | Aantal | Percentage | Aantal | Percentage |
| Fishel (Fishel,1990) | 225 | 82 | 36 | 12 | 5 |
| Fuscaldo (Fuscaldo,1991) | 25 | 12 | 48 | 2 | 8 |
| Gianaroli (Gianaroli,1991) | 60 | 39 | 65 | 3 | 5 |
| Imoedemhe (Imoedemhe,1991) | 45 | 28 | 62 | 6 | 13 |
| Krzyminska (Krzyminska,1991) | 32 | 20 | 62 | 7 | 22 |
| Malter (Cohen,1991) | 47 | 33 | 70 | 11 | 23 |
| Ng (Ng,1991) | 166 | 72 | 43 | 5 | 3 |
| Sathananthan (Sathananthan,1990) | 50 | 37 | 74 | 4 | 8 |
| Trounson (Sakkas,1992) | 112 | 39 | 35 | 2 | 2 |
| Steirteghem (Palermo,1990) | 128 | 96 | 75 | 18 | 14 |
| Wolf (Wolf,1991) | 36 | 24 | 76 | 5 | 14 |
| Totaal | 926 | 482 | 52 | 75 | 8 |

6.1 REFERENTIES

Barg PE, Wahrman MZ, Talansky BE, Gordon JW. Capacitated, acrosome reacted but immotile sperm, when microinjected under the mouse zona pellucida, will not fertilize the oocyte. *J Exp Zool* 1986; 237: 365-374.

Bongso TA, Sathananthan AH, Wong PC, Ratnam SS, Ng S-C, Anadakumar C, Ganatra S. Human fertilization by micro-injection of immotile spermatozoa. *Human Reprod* 1989; 4: 175-179.

Cohen J, Talansky BE, Malter H, Alikani M, Adler A, Reing A, Berkeley A et al. Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Human Reprod* 1991; 6: 118-123.

Fishel S, Jackson P, Antinori S, Johnson J, Grossi S, Versaci C. Subzonal insemination for the alleviation of infertility. *Fertil Steril* 1990; 54: 828-835.

Fishel S, Timson J, Lisi F, Rinaldi L. Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992; 57: 840-849.

Fuscaldo G, Sobieszczuk D, Trouson AO. Improved fertilization rates following microinjection of human spermatozoa, pretreated with 2'-deoxyadenosine and pentoxifylline. *Human Reprod* 1991; 6(suppl 1): 145.

Gianaroli, Sakkas D, Diotallevi L, Ferraretti A. The treatment of male factor infertility by sperm microinjection under the zona pellucida. *Human Reprod* 1991; 6(suppl 1): 383.

Imoedemhe D, Sique A. Preliminary experience with subzonal sperm injection in the treatment of male infertility in IVF. *Human Reprod* 1991; 6(suppl 1): 385.

Kola I, Lacham O, Jansen RPS, Turner M, Trounson A. Chromosomal analysis of human oocytes fertilized by microinjection of spermatozoa into the perivitelline space. *Human Reprod* 1990; 5: 575-577.

Krzyszewska U, Leung P, Cramberg van N, O'Neill C, Pike I. Routine use of microinsemination by sperm transfer (MIST) under zona pellucida of an oocyte for treatment of male infertility. *Human Reprod* 1991; 6(suppl 1): 146.

Lacham O, Trounson A, Holden C, Mann J, Sathananthan H. Fertilization and development of mouse eggs injected under the zona pellucida with single spermatozoa treated to induce the acrosome reaction. *Gamete Res* 1989; 23: 233-243.

Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* 1988; 49: 835-842.

Lassalle B, Courtot AM, Testart J. In vitro fertilization of hamster and human oocytes by microinjection of human sperm. *Gamete Res* 1987; 16: 69-78.

Lassalle B, Testart J. Human sperm injection into the perivitelline space (SI-PVS) of hamster oocytes: effect of sperm pretreatment by calcium-ionophore A23187 and freezing-thawing on

the penetration rate and polyspermy. *Gamete Res* 1988; 20: 301-311.

Laufer N, Simon A. Treatment of male infertility by gamete micromanipulation. *Human Reprod* 1992; 7: 73-80.

Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril* 1987; 48: 637-642.

Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38: 1077-1083.

Markert CL. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J Exp Zool* 1983; 228: 195-201.

Metka M, Haromy T, Huber J. Mikromanipulatorische Spermainjektion -ein neuer Weg in der Behandlung infertiler Männer?. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 1985; 135: 55-59.

Mortimer D, Curtis EF, Dravland JE. The use of strontium-substituted media for capacitating human spermatozoa: an improved sperm preparation method for the zona-free hamster egg penetration test. *Fertil Steril* 1986; 46: 97-103.

Ng S-C, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CLK, Wong PC et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 1988; 2: 790.

Ng S-C, Bongso A, Ratnam SS. Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 1991; 56: 1117-1123.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Steirteghem AC van. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into human oocytes. *Lancet* 1992; (in press).

Palmblad J, Mossberg B. Ultrastructural, cellular, and clinical features of the immotile-cilia syndrome. *Ann Rev Med* 1984; 35: 481-485.

Sakkas D, Lacham O, Gianaroli L, Trounson A. Subzonal sperm microinjection in cases of severe male factor infertility and repeated in vitro fertilization failure. *Fertil Steril* 1992; 57: 1279-1288.

Sathananthan AH, Ng S-C, Trounson A, Bongso A, Laws-King A, Ratnam SS. Human microinsemination by injection of single or multiple sperm: ultrastructure. *Human Reprod* 1989; 4: 574-583.

Steirteghem AC van, Palermo G. Questions arising from assisted fertilization. *TFO* 1992; 6: 38-40.

Wolf JP, Jouannet P. Intérêt des méthodes de microfécondation dans l'infertilité masculine. *Contracept Fertil Sex* 1991; 19: 880-888.

Yamada K, Stevenson AFG, Mettler L. Fertilization through spermatozoal microinjection: significance of acrosome reaction. *Hum Reprod* 1988; 3: 657-661.

SUBZONALE INSEMINATIE BIJ DE MUIS

7.1 INLEIDING

De eerste experimenten met subzonale inseminatie werden uitgevoerd in een muize-model.

Met behulp van deze experimenten moest ten eerste bewezen worden dat subzonale inseminatie voor eicel en zaadcel een veilige methode was, zonder dat degeneratie of ernstige beschadiging van de vitale bevruchtingsprocessen in dit model optrad.

Ten tweede moest bewezen worden dat op deze wijze kwalitatief goede embryo's konden ontstaan. Dit kan aangetoond worden door de ontwikkeling van de na subzonale inseminatie ontstane embryo's te vervolgen in een in-vitro kweek. Na een in-vitro bevruchting behoort de eicel zich binnen 24 uur te delen tot een tweecellig embryo en 24 uur daarna via een viercellig embryo tot een achtcellig embryo. Drie tot vier dagen na de bevruchting wordt het morula stadium bereikt. Rond de vijfde, zesde dag ontstaat de blastula, bestaande uit een perifere laag trofoblastcellen met een hierbinnen gelegen klompje van embryoblastcellen (de binnenste celmassa) en een centrale holte. De blastula zwelt gewoonlijk op de zesde dag op, stulpt door een holte uit de zona en slaat neer op de bodem van het petrischaaltje, wat 'uitgroei' of 'hatching' genoemd wordt.

Ten derde moest bewezen worden dat een via subzonale inseminatie tot stand gekomen embryo in staat was om zich in vivo verder te ontwikkelen tot een levensvatbare foetus en een gezonde nakomeling.

Al deze stappen in het onderzoek kunnen, zoals door diverse auteurs al beschreven is, uitgevoerd en onderzocht worden in een muizemodel (zie hiervoor ook hoofdstuk 2). Het proces van in-vitro-fertilisatie tot aan blastocystuitgroei en embryotransfer kan bij de muis in dezelfde media als bij de humane in-vitro-fertilisatie uitgevoerd worden.

In de verdere paragrafen van dit hoofdstuk zal eerst een beschrijving van de micro-injectietechniek gegeven worden. Dit wordt gevolgd door een beschrijving van de afzonderlijke experimenten, nl.

1. micro-inseminatie met verschillende aantallen zaadcellen
2. blastocystuitgroei na micro-inseminatie
3. transplantatie van micro-inseminatie embryo's
4. pronucleus inspectie na micro-inseminatie

Bij ieder experiment zullen de modificaties van de micro-injectie techniek beschreven worden en de resultaten van dat experiment. Aan het eind van dit hoofdstuk worden deze experimenten gezamenlijk bediscussieerd.

7.2 BESCHRIJVING VAN DE MICRO-INJECTIETECHNIEK

7.2.1 Verkrijgen van de gameten

In alle experimenten werden gameten gebruikt afkomstig van muizen uit de kruising tussen de stammen C57BL6J x CBA, verkregen van het proefdierenbedrijf van TNO te Rijswijk.

De dieren werden in geconditioneerde ruimten gehouden waar een constante temperatuur van 20°C heerste. Een 14 uur lange lichtperiode werd afgewisseld met een 10 uur durende donkerperiode van 22.00 uur tot 8.00 uur. Er werden muizen uit de leeftijdscategorie van 8 weken tot 1 jaar gebruikt.

Vrouwjesmuizen werden hormonaal gestimuleerd tot 'super-ovulatie' met behulp van 5 I.U. HMG (Humegon[®], Organon, Oss, Nederland), intraperitoneaal, om 22.00 uur toegediend. Na 46 tot 48 uur werd 5 I.U. HCG (Pregnyl[®], Organon, Oss, Nederland) intraperitoneaal gegeven. Tien uur na deze laatste injectie werden de muizen door cervicale dislokatie gedood en werden de oviducten uitgenomen. De oviducten werden gedeponereerd in een druppel 0.5 % hyaluronidase oplossing (Hyason[®], Organon, Oss, Nederland) in medium, aangevuld met 4 mg BSA/ml (Bovine Serum Albumine, Fluka Biochemika, Buchs, Zwitserland). Het medium werd geprepareerd zoals beschreven in Tabel 4.1. In plaats van GPO werd echter BSA als eiwitcomponent gebruikt.

Met behulp van twee naalden werd het oviduct ter hoogte van de door het oviduct schemerende cumulusmassa geopend. Druk op het oviduct rond de cumulusmassa stuwde deze in de oplossing. Binnen 5 minuten konden de cumuluscellen van de eicel losgeweekt worden d.m.v. heen en weer pipetteren in een capillair. Na verwijdering van de cumuluscellen werd het hyaluronidase weggewassen door de eicellen drie maal over te zetten in verse druppels medium. Daarna werden de 'schone' eicellen overgeplaatst naar een in de broedstoof geëquilibreerde druppel medium onder olie in een petrischaaltje.

De broedstoof (Forma Scientific, USA) was afgesteld op een temperatuur van 37°C en gevuld met CO₂/lucht mengsel met een CO₂ percentage van 5% bij een vochtigheidsspanning van 98%. Iedere dag werden de broedstoven geijkt op hun temperatuur en CO₂ percentage met behulp van respectievelijk een kwikthermometer en een capnograaf.

Zaadcellen werden verkregen uit de cauda epididymis en het vas deferens. Cauda en vas werden uit het abdomen van een mannetjesmuis genomen en in kleine partjes verdeeld. De stukjes weefsel werden opgelost in 1 ml medium in een reageerbuis. Gedurende één uur werd deze in de broedstoof geplaatst. Binnen één uur zakten de partjes epididymis en vas deferens uit en zwommen de zaadcellen op in het medium. De bovenstaande laag werd afgenomen, overgepipetteerd in een reageerbuis, aangevuld met 5 ml vers medium en gecentrifugeerd gedurende 5 minuten bij een snelheid van 500 g/min. De reageerbuis werd na centrifugering gedecanteerd, de bovenstaande vloeistof afgeschonken en gedurende 1 uur in de broedstoof geplaatst. De behandeling van de zaadcellen geschiedde in medium aangevuld met 30 mg BSA/ml.

Bij experiment IV vond de bewerking van de zaadcellen op een andere manier plaats (beschrijving zie aldaar).

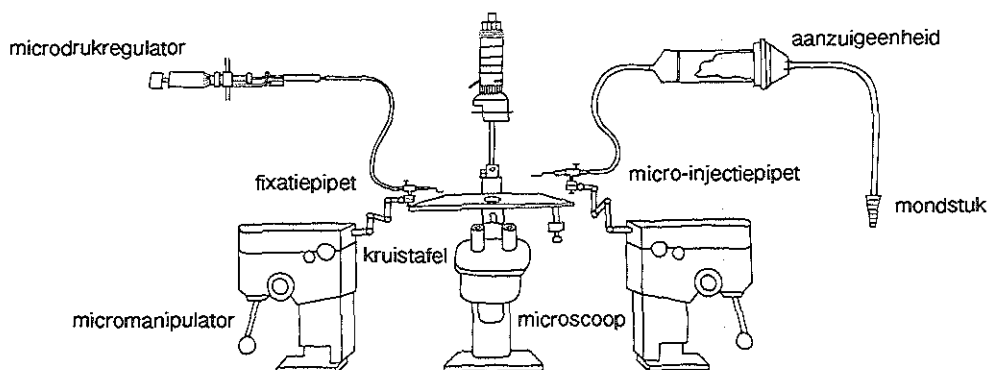
7.2.2 Vervaardiging en gebruik van de pipetten

De micro-injectiepipetten werden gemaakt van glazen capillairen, type 520-119 (Wild-Leitz, Het Lancet, Amsterdam). De voorbereidende bewerking geschiedde met een zogenaamde 'pipettrekker' (Vertical pipette puller model 720, David Kopf Instruments, Tujunga, California, U.S.A.). Met dit apparaat kunnen dunne glazen capillairen op een bepaalde plaats verhit worden. Door verhitting en trekkracht aan beide zijden van de capillair werd de capillair uitgetrokken, de mate van verhitting en de kracht bepalen de vorm en diameter van het breekpunt in de capillair. Uit één capillair ontstaan twee capillairen, beide met een smalle uitgetrokken punt.

Op een DeFonbrune microforge (Beaudouin, Parijs, Frankrijk) werden de punten op de gewenste diameter gesneden en werd een scherpe punt aan de pipet gemaakt. Op deze manier ontstond een pipetpunt met een inwendige diameter van 5 tot 10 μm en een uitwendige diameter van 15 tot 20 μm . De capillair werd dan met behulp van zegellak in een Pasteurse pipet bevestigd. Een flexibele doorzichtige rubber slang werd als aanzuigslang op de pipet geplaatst.

Door met de mond te zuigen of te blazen kon een zaadcel in de pipet opgezogen dan wel uitgeblazen worden. In de rubberslang bevond zich een kamertje met een flexibele impermeabele membraan die met de adembewegingen op en neer gaat. Besmetting van de kweek of van de onderzoeker kan zo vermeden worden. De opstelling van de micro-inseminatie-eenheid staat in figuur 7.1.

Fixatiepipetten voor eicellen werden uit dezelfde capillairen vervaardigd als de micro-injectiepipetten. De capillairen werden boven een gasvlam met de hand uitgetrokken. Daarop werden ze scherp afgesneden en werd met de DeFonbrune microforge het open uiteinde op de juiste diameter gesmolten. Bij de muize-experimenten werd gebruik gemaakt van een fixatiepipet met een uitwendige diameter van 50 tot 100 μm en een inwendige diameter van 10 tot 20 μm . De fixatiepipet werd verbonden met een met minerale olie gevuld systeem van smalle Portex-slangetjes (Resprecare Medical, Amsterdam). Aan het uiteinde bevond zich een 2 ml spuit (Terumo, Leuven, België). Deze spuit werd bevestigd in een zgn. microdrukregulator waarmee een zeer nauwkeurige regulatie van de druk van het systeem mogelijk was.



Figuur 7.1 Opstelling micro-inseminatie-eenheid

De micro-injectie- en de fixatiepipet werden gefixeerd in twee micromanipulators (Leitz, Duitsland) die aan weerszijden van de kruistafel van een omkeermicroscop stonden (zie figuur 7.1).

Microscop en micromanipulators stonden op een marmeren schokvrije-veerde tafel.

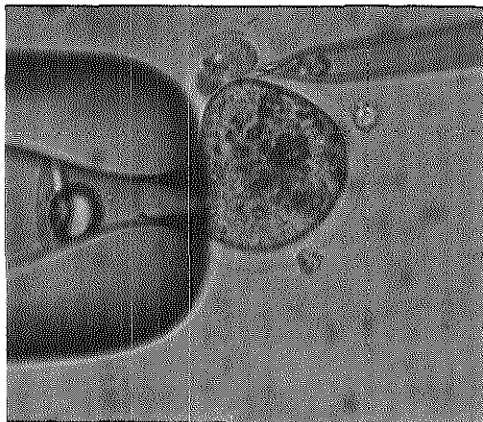
Met behulp van verhitting werden twee hoeken van 90° in de micro-injectie- en fixatiepipet gebogen, op deze manier was het mogelijk de pipetten in het vlak van de bodem van het petrischaaltje te laten bewegen, zonder dat de punten direct contact maakten met de bodem van het schaal-
tje.

7.2.3 Uitvoering van de micro-inseminatie

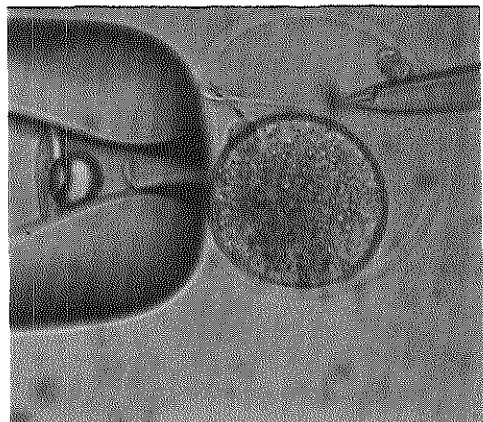
De petrischaaltjes waarin de micro-inseminatie plaatsvond waren gevuld met twee druppels medium op de bodem van het schaal-
tje en bedekt met minerale olie. Als medium voor de micro-inseminatie werd medium genomen aangevuld met 30 mg BSA/ml. De eerste druppel was bestemd voor de oöcyten, de tweede druppel, met een smalle uitloper richting eerste druppel, was bestemd voor de zaadcellen.

Eicellen werden getransporteerd in een smalle glazen capillair met een inwendige diameter van 160 µm. Deze capillair werd in het lumen van een Pasteurse pipet geschoven en vastgeplakt zodat ongeveer 1,5 cm van de capillair uit de pipet steekt. De Pasteurse pipet is verbonden met een plastic slang. Deze slang kon door adembewegingen met de mond bediend worden. Zaadcellen werden getransporteerd in een uitgetrokken Pasteurse pipet, ook verbonden aan een plastic slang.

Micro-inseminatie vond aldus plaats (zie figuur 7.2):



A



B

FIGUUR 7.2: Uitvoering micro-inseminatie. Foto A: de injectiepipet wordt tegen de zona pellucida geplaatst. Foto B: zaadcellen worden in de perivitelline ruimte gespo-
ten.

Zaadcellen werden in de tweede druppel gebracht, op een plaats zo ver mogelijk van de uitloper af. In de eerste druppel medium werden ongeveer 15 rijpe eicellen, in metafase II met een eerste poollichaampje, gedeponneerd. Het petrischaaltje werd op de kruistafel geplaatst en injectie- en fixatiepipet werden m.b.v. de micromanipulator in de eerste druppel gemanoeuvreerd. Nadat de pipetten op de juiste diepte d.w.z. die van eicellen geplaatst waren, werd de tweede druppel in beeld gebracht. Uit de uitloper werden de meest motiele zaadcellen opgezogen in de micro-injectiepipet, per poging ongeveer 20 zaadcellen.

Daarop werd de eerste druppel weer in beeld gebracht. Een oöcyt werd geroteerd m.b.v. de fixatiepipet totdat het poollichaampje op de positie van 12 uur lag ten opzichte van de eicel en vastgezogen. De zona pellucida stulpte dan in de fixatiepipet. De injectie-pipet werd op een positie tussen 2 en 3 uur tegen de zona pellucida geplaatst. Bij druk met de punt tegen de zona, sneed de injectie-pipet door de zona en tussen het poollichaampje en eicel in. Eerst boog de zona om de punt heen en met een klein schokje schoot de pipet de perivitelline ruimte in. Hier werden de zaadcellen uitgeblazen. De zaadcellen bevonden zich in de injectie-pipet op een gereede afstand van elkaar, een goede controle van het aantal geïnsemineerde zaadcellen is zo mogelijk. Indien zich echter twee of drie zaadcellen vlak bij elkaar bevonden was het mogelijk dat deze gelijktijdig in de perivitelline ruimte schoten.

Na afloop van de micro-inseminatie werden de eicellen overgezet in medium met 30 mg BSA/ml en in de broedstoof geplaatst.

De micro-inseminatie vond plaats tussen 11.00 en 13.00 uur.

7.2.4 Controle-experiment: in-vitro-inseminatie met muizegameten

In-vitro-inseminatie met muizegameten werd steeds gebruikt als controle-experiment voor de micro-inseminatie. Eicellen werden, zoals boven beschreven, verkregen na een superovulatiebehandeling. Daarna werden de cumuluswolken behandeld met hyaluronidase en werden de eicellen aselekt verdeeld in twee groepen, één voor micro-inseminatie en één voor in-vitro-inseminatie. Ook de zaadcellen voor micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie werden uit hetzelfde monster genomen. Na centrifugering en opzwemmen van de zaadcellen werden zaadcellen afgenomen.

Voor in-vitro-inseminatie werden de zaadcellen verdund tot een concentratie van 100.000 zaadcellen/ml in medium met daaraan toegevoegd 30 mg BSA/ml. Van deze zaadceloplossing werden druppels gemaakt van 250 µl in een petrischaaltje en bedekt met minerale olie. Per druppel werden 10 eicellen toegevoegd.

Eicellen en zaadcellen werden bij beide methoden gedurende dezelfde tijd buiten de stoof gehouden.

Na een incubatie van 6 uur in de druppel zaadcellen in de broedstoof werden de eicellen overgezet in een verse druppel medium met 30 mg BSA/ml. Vierentwintig uur na de inseminatie werden de eicellen bekeken op bevruchting en doorgroei tot het tweecellig stadium.

7.3 EXPERIMENT 1: MICRO-INSEMINATIE MET VERSCHILLENDE AANTALLEN ZAAD-CELLEN.

7.3.1 Inleiding

In dit experiment werd de injectie van verschillende aantallen zaadcellen vergeleken. Het doel was om een zo hoog mogelijk percentage bevruchte eicellen te verkrijgen. Tevens moest bij dit experiment bewezen worden dat micro-inseminatie uitgevoerd kan worden zonder dat teveel eicellen degenereren na een inseminatie.

Bekend is dat niet alle zaadcellen binnen twee uur een acrosoomreactie ondergaan hebben (Talansky,1987) en dat niet alle acrosoom gereageerde zaadcellen kunnen bevruchten (Lacham,1989). Een injectie van meer zaadcellen geeft daarom meer kans op bevruchting dan de injectie van één zaadcel.

In de allereerste experimenten bleek echter dat de injectie van meer dan vijf zaadcellen zeer moeilijk was. Er was nl. geen ruimte tussen de zona en eicel om meer dan vijf zaadcellen te injecteren. De zona wordt door injectie van zaadcellen en medium opgeblazen. Wanneer het geïnjecteerde volume te groot was, werd de weerstand van de zona tegen uitblazen te groot of klapte de zona pellucida open. Bovendien zijn zaadcellen van de muis t.o.v. de muize-eicel relatief veel groter dan zaadcellen van de mens t.o.v. de menselijke eicel, waardoor micro-injectie van grote aantallen zaadcellen bij de mens gemakkelijker is dan bij de muis. Indien meer dan één zaadcel geïnjecteerd wordt en meer dan één zaadcel kan bevruchten, bestaat de kans op polyspermie.

Tien uur na de injectie kunnen de pronuclei bestudeerd worden. Dit werd in eerste instantie gepoogd m.b.v. een standaardbelichting op een omkeermicroscop of via een zgn. 'squash'-preparaat van de embryo's (hierbij wordt de eicel platgedrukt tussen objectglas en dekglas). Het bleek echter onmogelijk om pronuclei te onderscheiden in het zeer heterogene cytoplasma bij de eicellen van de gebruikte muizestam. Voor dit onderzoek is de zgn. Nomarski-interferentiemicroscop benodigd. Omdat deze pas enige tijd na het begin van de experimenten werd verkregen, wordt de toepassing hiervan pas bij experiment 4 beschreven.

Daarom werd bij de eerste drie experimenten als criterium voor bevruchting het bereiken van het tweecellig stadium genomen en de aanwezigheid van een tweede poollichaampje 20 uur na micro-inseminatie.

Behandelde eicellen werden in twee groepen verdeeld, eicellen waar één zaadcel geïnjecteerd was en eicellen waar twee tot vijf zaadcellen geïnjecteerd waren. Het was zeer moeilijk om een van te voren vastgesteld aantal zaadcellen te injecteren. Zaadcellen op een kluitje kunnen niet afzonderlijk geïnjecteerd worden. Nadien is het onderscheid tussen drie, vier of vijf bewegende zaadcellen onder de zona zeer moeilijk, met de microscoop kunnen maar twee dimensies bekeken worden, zaadcellen zwemmen in drie dimensies. Ook andere onderzoekers blijken dit onderscheid niet te kunnen maken (Lassalle,1987).

Vooraf werden de zaadcellen willekeurig verdeeld over twee groepen, één voor micro-inseminatie en één voor in-vitro-inseminatie. Bewerking van eicellen en uitvoering van micro-inseminatie geschiedde zoals boven beschreven.

7.3.2 Resultaten

Het experiment werd 8 maal herhaald. Bij ieder experiment werden 2 of 3 muizen gestimuleerd tot superovulatie middels HMG en HCG. De rijpe eicellen werden verdeeld over twee groepen, één voor micro-inseminatie en één voor in-vitro-inseminatie. De gemiddelde eicelopbrengst per gestimuleerde muis bedroeg in de vijf eerste uitvoeringen van dit experiment 26 ± 6 rijpe eicellen. Aangezien met 2 muizen voldoende aantallen rijpe eicellen werden verkregen voor de uitvoering van een experiment werden bij de volgende uitvoeringen de totaal aantallen eicellen niet meer geteld.

Het aantal eicellen dat de micro-injectie overleefde verschilde zeer sterk van proef tot proef. Tijdens 12 proefnemingen die verdeeld waren over de experimenten 1, 2 en 3 was het percentage overleving per poging 52 % met een standaarddeviatie van ± 20 %. Bij experiment 4 daarentegen werd geen enkele eicel beschadigd.

De eicellen bestemd voor micro-inseminatie werden verdeeld in twee groepen, beurtelings werden 5 eicellen geïnjecteerd met 1 zaadcel of met 2-5 zaadcellen.

In tabel 7.1 staan de resultaten vermeld van de eicellen die de micro-inseminatie doorstonden. Van de 47 eicellen na micro-inseminatie met een zaadcel ontstonden er 8 tweecellige embryo's (17 %). Uit de 51 eicellen die met 2 tot 5 zaadcellen werden geïnsemineerd ontstonden er 24 tweecellige embryo's (47 %). In het controle experiment ontstonden er 84 tweecellige embryo's uit 187 eicellen (45 %).

TABEL 7.1: Micro-inseminatie bij eicellen van de muis:
micro-inseminatie van één versus 2-5 zaadcellen.

| | micro-inseminatie | | in-vitro-inseminatie |
|------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | 1 zaadcel | 2-5 zaadcellen | |
| # eicellen | 47 | 51 | 187 |
| # embryo's | 8 (17%) ¹ | 24 (47%) ^{1,2} | 84 (45%) ² |

1 $\chi^2=10,03, p<0,005$;

2 $\chi^2=0,07, p=0,79, n.s.$

7.4 EXPERIMENT 2: ONTWIKKELING VAN MUIZE-EMBRYO'S, ONTSTAAN NA MICRO-INSEMINATIE.

7.4.1 Inleiding

Bij dit experiment werd de doorgroei van tweecellige embryo's na micro-inseminatie bestudeerd. Opnieuw werden de eicellen verdeeld. Een groep voor micro-inseminatie met twee tot vijf zaadcellen en een groep voor een in-vitro-inseminatie. Eicellen werden voor beide methoden van bevruchting op dezelfde wijze voorbereid als reeds eerder beschreven nl. een hyaluronidasebehandeling en vijftien minuten blootstelling aan de lucht.

Twintig uur na de inseminatie werd het aantal tweecellige embryo's geteld. Deze werden daarna in een schone druppel medium overgeplaatst (met 4 mg BSA/ml). Uit eigen experimenten en literatuur is namelijk bekend dat bevruchting en ontwikke-

ling tot het tweecellig stadium het best geschiedt in eiwitrijk medium en dat een embryo na passage van het tweecellig stadium een minder eiwitrijk medium behoeft (Hogan, 1986).

De embryo's doorlopen de stadia van morula, blastula en 'uitgezette' (expanded)-blastula. Dit laatste stadium wordt gevolgd door het ontsnappen van het embryo uit een smalle opening in de zona, hatching. De tijd van inseminatie tot aan hatching bedraagt normaal vijf tot zeven dagen. Een embryo dat de zona verlaten heeft slaat neer op de bodem van het petrischaaltje. Op de bodem is dan een spinnerag van uitgestrekte trofoblastcellen te zien met centraal een klompje cellen, de binnenste cel-massa.

De ontwikkeling van een uitgroeiende blastocyst is afhankelijk van de kwaliteit van de bevruchte eicel. Alleen een rijpe eicel bevrucht door een functioneel perfecte zaadcel zal zich goed kunnen ontwikkelen tot een embryo. De ontwikkeling van embryo's is natuurlijk ook afhankelijk van de kweekomstandigheden.

7.4.2 Resultaten

Het experiment werd 15 maal herhaald. Steeds werden 2 tot 3 muizen gestimuleerd met 5 IU HMG, 48 later gevolgd door 5 IU HCG per muis. In tabel 7.2 zijn de resultaten beschreven.

TABEL 7.2: Hatching van muize-embryo's na micro-inseminatie en na in-vitro-inseminatie

| | micro-inseminatie | in-vitro-inseminatie |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| # eicellen | 160 | 301 |
| # tweecellige embryo's | 86 (53,8%) ¹ | 145 (48,2%) ¹ |
| # embryo's met hatching | 38 | 51 |
| % hatching/eicellen | 23,6% ² | 17,0% ² |
| % hatching/embryo's | 44,2% ³ | 35,2% ³ |

1 $\chi^2=1,30, p=0,25, n.s.$; 2 $\chi^2=3,10, p=0,08, n.s.$;

3 $\chi^2=1,85, p=0,17, n.s.$

Er waren 160 eicellen beschikbaar, waarbij 2 tot 5 zaadcellen geïnjecteerd werden, en 86 hiervan waren de volgende dag tweecellig (54%). Uit deze 86 tweecellige embryo's ontstonden 38 blastocysten die hatching ondergingen. Het percentage hatching is in tabel 7.2 zowel uitgedrukt t.o.v. het totaal aantal eicellen (23,6%) als t.o.v. het aantal tweecellige embryo's (44,2%).

Bij de controle in-vitro-inseminatie ontstonden 145 tweecellige embryo's uit 301 eicellen (48,2%). Eenenvijftig van deze tweecellige embryo's ontwikkelden zich tot hatching blastocyst.

7.5 EXPERIMENT 3: TRANSPLANTATIE VAN MICRO-INSEMINATIE-EMBRYO'S.

7.5.1 Inleiding

Effectiviteit en resultaat van micro-inseminatie kan zowel bewezen worden door het bevruchttingsproces te bestuderen als ook door de kwaliteit van embryo's te beoordelen. Het verlangde resultaat is echter levende, gezonde nakomelingen die ontstaan uit deze embryo's. Dit kan bereikt worden door transplantatie van embryo's naar acceptormoeders.

7.5.2 Methoden

Transplantatie werd als volgt uitgevoerd. 's Ochtends werden de vrouwelijke dieren in oestrus geselecteerd op een vaginale prop en apart gezet. Deze vrouwtjesmuizen hadden 's nachts gepaard met een gevasectomeerde mannetjesmuis (halve dag post coitum). Diezelfde middag werd het aantal tweecellige embryo's dat m.b.v. micro-inseminatie verkregen was geteld. Micro-inseminatie had de dag vòòr transplantatie plaatsgevonden op de manier zoals reeds eerder beschreven. Er werden maximaal 6 embryo's per oviduct getransplanteerd. Indien er meer embryo's waren werden deze verdeeld over twee acceptormoeders.

De acceptormoeder werd verdoofd met 0.1 ml Avertine-oplossing. Avertine kan gemaakt worden uit 10 g tribroommethylnalcohol en 10 ml tertiaire amylalcohol. Een 50-voudig in fysiologisch zout verdunde oplossing werd gebruikt voor injectie.

De verdere handelingen vonden plaats onder een loep met een vergroting van 10 maal. Ter hoogte van de laatste rib werd een longitudinale incisie, langs de middellijn, in de richting van de staart gemaakt. Ovarium, oviduct en uterushoorn werden opgezocht en uit de buikholte getild. Ter hoogte van de overgang ovarium en oviduct werd een snede in de bursa ovarica gemaakt.

Met een dunne glazen pipet, uitwendige diameter $\pm 110 \mu\text{m}$ en inwendige diameter $\pm 90 \mu\text{m}$, werd eerst een kleine hoeveelheid medium opgezogen, dan een luchtbel en vervolgens de embryo's met medium. De embryo's konden zonder vervorming in de smalle pipet opgezogen worden. De pipet paste op zijn beurt precies in het uiteinde van het oviduct. De pipet werd door de snede in de bursa en door het distale uiteinde van het oviduct geschoven. Als de pipet goed in het oviduct was geplaatst werden de embryo's uitgeblazen. De luchtbel die als eerste was opgezogen volgde als laatste. Zo bestond er controle dat de embryo's inderdaad in het oviduct uitgeblazen waren. De pipet werd teruggetrokken, de slippen van de bursa gleden tegen elkaar en ovarium en oviduct werden terug in de buikholte geplaatst. Fascie en huid werden gesloten. Een half uur na het toedienen van de Avertine kwamen de meeste muizen weer tot bewustzijn.

Ongeveer 20 dagen na transplantatie kon de geboorte van de nakomelingen worden verwacht.

7.5.3. Resultaat

Uit de 89 getransplanteerde embryo's werden 23 nakomelingen geboren waaraan geen macroscopische afwijkingen te zien waren. Ieder getransplanteerd embryo bezat dus 25,8 % kans om uit te groeien tot een volwaardige nakomeling (zie tabel 7.3).

Er werden 89 embryo's getransplanteerd naar 16 acceptoren. Gemiddeld werden er 5,6 embryo's getransplanteerd per acceptor en daaruit werden gemiddeld 1,44 nakomelingen geboren per acceptor.

Als alleen de acceptoren met nakomelingen beschouwd worden, dan werden er 53 embryo's getransplanteerd naar 9 acceptoren. Ofwel per acceptor met nakomelingen werden er gemiddeld 5,9 embryo's getransplanteerd en 2,56 nakomelingen geboren. Als een embryo getransplanteerd werd naar een acceptor met nakomelingen had het dus 43 % kans om uit te groeien tot een volragen jong.

De resultaten van embryo-transplantatie in de controlegroep, de transplantatie van in-vitro-inseminatie embryo's, waren niet statistisch significant verschillend van die van transplantatie van micro-inseminatie-embryo's (zie tabel 8.3).

TABEL 7.3: Resultaten na transplantatie van micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie embryo's.

| | micro-inseminatie | in-vitro-inseminatie |
|--|--------------------|----------------------|
| # embryo's getransplanteerd | 89 | 187 |
| # acceptormuizen | 16 | 20 |
| # nakomelingen | 23 | 40 |
| % nakomelingen/getransplanteerde embryo's | 25,8% ¹ | 21,3% ¹ |
| # acceptoren met nakomelingen | 9 | 10 |
| # embryo's getransplanteerd bij acceptoren met nakomelingen | 53 | 106 |
| % nakomelingen/getransplanteerde embryo's bij moeders met nakomelingen | 43,4% ² | 37,7% ² |

1 $\chi^2=0,68, p=0,41, n.s.$; 2 $\chi^2=0,47, p=0,49, n.s.$

7.6 EXPERIMENT 4: PRONUCLEUSINSPECTIE VAN MUIZE-OOCYTEN NA MICRO-INSEMINATIE.

7.6.1 Inleiding

Zoals beschreven in hoofdstuk 1 wordt het bewijs dat één eicel bevrucht is door één zaadcel, geleverd door de aanwezigheid van twee pronuclei en de vorming van het tweede poollichaampje.

Bij de door ons gebruikte muizestam (de F1 generatie van de kruising C57Bl/6J x CBA/J) is het echter zeer moeilijk pronuclei te herkennen in het heterogene cytoplasma. Pas nadat de experimenten 1, 2 en 3 voltooid waren, kwam de benodigde apparatuur tot onze beschikking.

7.6.2 Methoden

De eicellen werden opnieuw verkregen m.b.v. HMG- en HCG-stimulatie. De zaadcellen werden uit het vas deferens en caput epididymis van een mannetjesmuis geïsoleerd. De partjes weefsel werden opgevangen in medium aangevuld met een 15% GPO (Gepasteuriseerde Plasmaeiwit Oplossing, Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis, Amsterdam, Nederland). Na een half uur werd de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd en gecentrifugeerd, 500 g gedurende 5 min. De reageerbuis werd gedecanteerd en gedurende een half uur in de broedstoof geplaatst. Voor micro-inseminatie werden motiele zaadcellen overgezet in medium aangevuld met 30 mg BSA/ml.

De micro-inseminatie vond 's ochtends plaats tussen 11.00 en 12.00 uur in medium met 30 mg BSA/ml. Tien uur later vond de pronucleusinspectie plaats met behulp van Nomarski-interferentie microscopie. De oöcyten werden overgezet in een kleine druppel medium op een objectglaasje, vijf oöcyten per druppel. Met een vergroting van 400 maal werd het aantal pronuclei bekeken en de aan- of afwezigheid van het tweede poollichaampje. De eicellen werden in vier groepen verdeeld, groep 1: eicellen met twee pronuclei, groep 2: eicellen zonder pronuclei, groep 3: eicellen met drie of meer pronuclei en groep 4: eicellen met één pronucleus.

De volgende ochtend (24 uur na micro-inseminatie) werd het aantal tweecellige embryo's geteld in de vier groepen. De embryo's werden dan overgezet in medium bestaande uit cocktail aangevuld met 4 mg BSA. De embryo's werden vervolgd tot aan de hatching (zie experiment 2).

7.6.3 Resultaten

Het experiment werd 5 maal herhaald (Tabel 7.4).

TABEL 7.4: Pronucleusinspectie van muize-eicellen na micro-inseminatie

| | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| # eicellen | 168 | | |
| # eicellen met tweede poollichaampje | 133 | | |
| # pronuclei | 2 pronuclei | 0 pronuclei | 3 pronuclei |
| # eicellen met pronuclei | 122 (72,6%) | 43 (25,6%) | 3 (1,7%) |
| # tweecellige embryo's | 119 | 5 | 3 |
| # hatching blastocysten | 62 (52,1%) | 0 | 0 |

In totaal ondergingen 168 eicellen micro-inseminatie. Tien uur na behandeling vertoonden 133 eicellen een tweede poollichaampje. Er waren 122 eicellen met 2 pronuclei (73 %), 43 eicellen zonder pronuclei (25 %) en 3 eicellen met 3 pronuclei (2 %). Eicellen met één pronucleus of met meer dan 3 pronuclei werden niet gezien.

De volgende dag waren 119 van de 122 eicellen met twee pronuclei tweecellig, uit de 43 eicellen zonder pronuclei ontstonden 5 tweecelligen, de drie eicellen met drie pronuclei werden alle tweecellig. Na kweek ontstonden alleen uit de twee pronuclei-groep 62 blastocysten met hatching. Het percentage uitgroei bedroeg 52,1% t.o.v. het totaal aantal ontstane embryo's met twee pronuclei.

7.7 DISCUSSIE

Bij deze experimenten is gekozen voor de gameten van de F1-hybride van de ingeteelde muizestammen C57Bl/6J en CBA/J. De F1-hybride van deze muizestammen levert namelijk meer embryo's op dan de ouderstammen (Brinster,1985). In-vitro kunnen ééncellige zygoten van de F1-hybride goed verder gekweekt worden tot het blastocyststadium. Bij de meeste inteeltstammen of bij kruisingen tussen in het wild levende muizestammen lukt deze doorgroei slechts in een beperkt aantal gevallen (Whittingham,1975). Een beschrijving van deze zgn. tweecelblokkade volgt verderop in deze paragraaf.

Het verkrijgen van eicellen geschiedde d.m.v. superovulatie m.b.v HMG en HCG. Het voordeel van superovulatie boven de natuurlijke eisprong bij de muis is dat meer eicellen per muis verkregen kunnen worden. Bij de F1-hybride C57Bl/6J x CBA/J worden na superovulatie 20 tot 30 eicellen verkregen, bij een natuurlijke eisprong komen gemiddeld 8 tot 10 eicellen vrij (Hogan,1986). In onze experimenten werden gemiddeld 26 eicellen verkregen per muis na superovulatie. Er is in de literatuur niet veel bewijs te vinden voor de stelling dat gesuperovuleerde eicellen slechter van kwaliteit zijn dan eicellen na een natuurlijke eisprong (Gates,1965).

Superovulatie heeft dus geen invloed op het bevruchtingspercentage en doorgroei van embryo's. De behandeling met hyaluronidase en de relatief lange tijd die eicellen en embryo's in onze experimenten in de buitenlucht verkeren, hebben dit wel. In vergelijking tot andere studies is het percentage bevruchting na een in-vitro-inseminatie in onze studie laag (45 en 48%). Fraser en medewerkers behaalden na een incubatie van 6 uur van eicellen met zaadcellen een bevruchtingspercentage van 90% (Fraser,1976).

Het snel verplaatsen van eicellen en embryo's na isolatie uit de muis naar de stoof is zeer essentieel voor een goede kwaliteit van de embryo's. De eicellen die micro-inseminatie ondergingen en de eicellen uit de controle-experimenten bleven ongeveer een half uur buiten de stoof tot de procedure voltooid was.

Buiten chemische en omgevingsfactoren kan bij de micro-inseminatie mechanische beschadiging natuurlijk een grote rol spelen. Tijdens de verschillende experimenten bleek het percentage beschadigde oöcyten sterk te verschillen. Tijdens de eerste drie experimenten was de overleving gemiddeld 52 %. De belangrijkste factor bleek de grootte en de vorm van de injectiepipet te zijn. Aangezien deze pipetten met de hand werden gemaakt bestond er veel variatie tussen de pipetten. Een te grote pipet met botte punt veroorzaakte veel schade. Pas bij het vierde experiment bestond voldoende vaardigheid om een serie goede pipetten te produceren. Bij dit experiment werd dan ook geen van de 168 eicellen beschadigd.

Ook het rijpingsstadium van de oöcyt speelt een rol bij de procedure. Bij een rijpe eicel, in metafase II, met een intact eerste poollichaampje bestaat er meer ruimte om een micropipet in de perivitelline ruimte te plaatsen dan bij een eicel met een reeds gedegeneerd poollichaampje of bij afwezigheid van het poollichaampje.

Aan het medium werd een extra hoeveelheid BSA toegevoegd, om de kleverigheid van de embryo's te verminderen en om verontreinigingen te absorberen (Hogan,1986). Een hoge concentratie BSA bevordert ook de bevruchting van muize-eicellen. Mogelijk speelt het eiwit een rol bij de capacitatie van de zaadcellen of stimuleert het de acrosomale enzymen (Quinn,1982).

In onze experimenten werd dan ook voor de bewerking van zaadcellen en voor de bevruchting het standaardmedium gebruikt aangevuld met 30 mg/ml BSA. Zaadcellen bewegen bovendien in de visceuze vloeistof trager dan normaal en zijn zo makkelijker op te zuigen in de micro-inseminatie pipet.

Zes uur na inseminatie werden de eicellen overgezet van medium met 30 mg/ml BSA naar medium met 4 mg/ml BSA.

In de eerste studie werd gepoogd inseminatie met 1 versus 2-5 zaadcellen zoveel mogelijk af te wisselen. Per experiment ontstonden echter verschillen doordat eicellen degenereerden door de manipulatie. De totale aantallen overlevende eicellen na inseminatie zijn enigszins vergelijkbaar, de bevruchtingspercentages zijn dat echter niet. Inseminatie met hogere aantallen zaadcellen bevordert de bevruchting duidelijk (tabel 7.1).

Het bevruchtingspercentage na inseminatie met één zaadcel is vergelijkbaar met dat van Mann (Mann,1988), nl. 17% in onze studie versus 25 % bij Mann.

Micro-inseminatie met meer dan één zaadcel onder de zona zal meer kans geven op de aanwezigheid van een acrosoomvrije zaadcel onder de zona pellucida. Dit kan echter het hoger percentage bevruchting na micro-inseminatie met meer zaadcellen niet verklaren. Lacham heeft namelijk bewezen dat inductie van de acrosoomreactie bij zaadcellen die gebruikt werden voor micro-inseminatie niet tot een hoger bevruchttingspercentage leidde (Lacham,1989). Waarschijnlijk spelen andere eigenschappen van de zaadcellen een rol bij het wel dan niet bevruchten van de eicel.

In het onderhavige experiment was het bevruchttingspercentage van de injectie van 2-5 zaadcellen vergelijkbaar met in-vitro-inseminatie (47% versus 45%). Het maximale bevruchttingspercentage dat meestal behaald wordt is 90%, dit wordt alleen behaald als alle eicellen rijp zijn, er voldoende aantallen bevruchtende zaadcellen aanwezig zijn en als de kweekomstandigheden optimaal zijn (Fraser,1976). In onze experimenten kon aan de eerste twee voorwaarden voldaan worden. De kweekomstandigheden konden echter niet optimaal gehandhaafd blijven. Om de tijd die nodig was voor de micro-inseminatie na te bootsen, bleven de eicellen gedurende enige tijd buiten de broedstoof. Het maximaal te behalen bevruchttingspercentage was daarom maar 45 %.

Na micro-inseminatie met één zaadcel was het bevruchttingspercentage 17%, ongeveer 1/3 van het maximaal haalbare resultaat (45%). Gezien het feit dat de eicellen en de kweekomstandigheden in beide experimenten vergelijkbaar zijn, is te concluderen dat 1/3 deel van de goed bewegende zaadcellen in staat is tot bevruchting na micro-inseminatie.

Omdat de injectie van meer dan één zaadcel een beter resultaat had, werden in experiment twee, drie en vier twee tot vijf zaadcellen onder de zona gebracht.

In het tweede experiment werd na micro-injectie de doorgroei en uitgroei van de embryo's bestudeerd. De gameten van de F1 hybride C57Bl/6J x CBA/J kunnen in vitro gekweekt worden tot aan het blastocyststadium. Naar doorgroei, energiegebruik en eiwit metabolisme is al veel onderzoek verricht. De embryo's doorlopen de stadia tot aan de blastocyst zoals beschreven in tabel 7.5:

SUBZONALE INSEMINATIE BIJ DE MUIS

TABEL 7.5: Tijdschema van groei van het muize-embryo

| Stadium | Uren na bevruchting |
|----------------------|---------------------|
| één cel | 0-18 |
| twecellig | 18-24 |
| 3-4 cellig | 24-30 |
| 8-16 cellig (morula) | 48-72 |
| morula - blastula | 72-96 |
| blastula | 96-120 |
| hatching blastula | 120-168 |

Het volume van het embryo neemt tot het blastocyststadium niet toe net zo min als de totale hoeveelheid cytoplasma in het embryo, zie tabel 7.6.

TABEL 7.6: Volume en eiwitgehalte van het muize-embryo

| Stadium | Volume (μm^3) ¹ | Eiwit (ng/embryo) ² |
|-------------|---|--------------------------------|
| ééncellig | 192.000 | 27,8 \pm 0,51 |
| twecellig | 158.000 | 26,1 \pm 0,41 |
| viercellig | 162.000 | - |
| achtcellig | 138.000 | 23,4 \pm 0,32 |
| morula | 219.000 | 20,6 \pm 0,74 |
| blastocyste | - | 23,9 \pm 0,63 |

1 Lewis,1935; 2 Brinster,1967

Over de kweek van ééncellige zygoten tot aan het blastocyststadium bij de muis is veel onderzoek verricht. Zowel naar de veranderingen binnen het embryo als naar de benodigde essentiële bestanddelen van het medium.

Het muize-embryo gebruikt tijdens de ontwikkeling van bevruchte eicel tot aan het twecellig stadium voornamelijk eiwit en RNA dat tijdens de oögenese aangemaakt is (Hawlett,1985). Synthese van eiwitten door transcriptie op mRNA van het embryonaal genoom geschiedt pas na het twecellig stadium (Flash,1982). Het embryo is voor zijn energievoorziening tot aan het achtcellig stadium afhankelijk van pyruvaat en lactaat, daarna gaat het embryo glucose gebruiken (Iyengar,1983).

Het was al geruime tijd mogelijk twecellige embryo's te kweken tot blastocysten (Whitten,1957). Pas in 1968 konden Whitten en Biggers in optimale kweekomstandigheden ééncellige embryo's kweken tot blastocysten (Whitten,1968). Het was voor het eerst dat de zgn. tweecelblokkade gepasseerd kon worden. Tot dan toe bleven ééncellige embryo's na éénmaal delen in het twecellig stadium. De oorzaak voor deze delingsblokkade wordt gezocht in de eigenschappen van de gebruikte muizestam (Abramczuk,1977), in de mediumcomponenten (Cross,1973; Chatot,1989) en kweekomstandigheden (Quinn,1978).

Van de door ons gebruikte muizestam (C57Bl/6J x CBA/J) is al lang bekend dat ééncellige embryo's kunnen doorgroeien tot blastocysten en dat dit niet het gevolg is van een speciale samenstelling van het medium.

Bij in-vitro-fertilisatie van muizegameten behaalden Hoppe en Pitts een bevruch-

tingspercentage van 92%, met een doorgroeipcentage van 87% (of 95% van het aantal bevruchte eicellen) (Hoppe,1973). Deze resultaten zijn nooit verbeterd. Worden gameten en embryo's onder minder optimale omstandigheden voorbehandeld en gekweekt dan zal het percentage bevruchting en doorgroei lager zijn.

De hatching (uitgroei) van blastocysten uit de zona vindt plaats nadat de blastocyste een sterke zwelling heeft ondergaan (Hartshorne,1991). De zona splijt op een bepaalde plaats open, waarna de blastocyste uit de zona kruipt. Dit is niet louter een mechanisch gebeuren. Bij het muize-embryo bijvoorbeeld, is een aan trypsine verwant enzym gevonden, dat de zona oplost. Dit enzym wordt slechts door een deel van het trophoctoderm geproduceerd (Perona,1986). Mechanische krachten spelen echter ook een rol: muizeblastocysten vertonen contracties, waardoor de zona gespleten wordt. Met deze contracties 'kruipen' ze ook uit de zona (Cole,1967). Als eindresultaat is dan een lege zona te zien, zwevend in de druppel medium, en een vrije blastocyste die zich aan de bodem van het kweekschaaftje hecht. Hatching is te beschouwen als een voorbereiding op de implantatie (Hartshorne,1991).

In experiment 2 werden de resultaten van micro-inseminatie met 2-5 zaadcellen vergeleken met die van in-vitro-inseminatie. Na bevruchting werden de ontstane embryo's doorgekweekt. Zoals te zien in tabel 7.2 is er slechts een klein verschil in bevruchtungskans tussen beide technieken. Het verschil in de hatchingpercentages is echter veel groter, 44,2% na micro-inseminatie en 35,2% na in-vitro-inseminatie.

Aangezien de behandeling van de embryo's na het tweecellig stadium identiek is, moeten de behandelingen voorafgaand aan de bevruchting het gevonden verschil verklaren. De gameten zijn bij beide technieken op dezelfde wijze voorbehandeld. Zaadcellen en eicellen zijn beide gedurende even lange tijd buiten de stoof geweest. Het is evenwel mogelijk dat de bevruchting na micro-inseminatie sneller plaatsvindt dan na in-vitro-inseminatie. Bij in-vitro-inseminatie moeten de zaadcellen immers eerst nog de zona pellucida passeren. De eicel wordt na micro-inseminatie sneller geactiveerd dan na in-vitro-inseminatie. De activering van de processen die het embryo nodig heeft om de tweecelblokkade te passeren en die het doen 'hatchen' vinden waarschijnlijk eerder plaats na micro-inseminatie. Deze processen blijven na in-vitro-inseminatie mogelijk langere tijd in een kwetsbare fase inactief, waardoor vaker schade aan deze processen plaatsvindt.

Bekend is dat zonavrije eicellen sneller bevrucht worden dan eicellen omgeven door hun zona. Volgens Wolf (Wolf,1978) kost de passage van de zona de meeste tijd, na de penetratie van de zona treedt een snelle eicelzaadcellfusie op.

Het is wel opvallend dat een invasieve ingreep, zoals micro-inseminatie, niet tot de vorming van kwalitatief minder goede embryo's leidt. Ook werd nooit gezien dat embryo's na micro-inseminatie voortijdig door het litteken in de zona pellucida naar buiten stulpen.

Uit dit experiment kan dus geconcludeerd worden dat micro-inseminatie niet tot de vorming van minder levensvatbare embryo's leidt dan in-vitro-inseminatie.

Transplantatie van muize-embryo's wordt al geruime tijd toegepast (Boot,1956). McLaren publiceerde aan het eind van de vijftiger jaren diverse artikelen over de transplantatie van muize-embryo's naar de uterus van een acceptormoeder (McLaren,1956; McLaren,1958).

De beste resultaten met embryotransplantatie worden bereikt door embryo's van het ééncellig- tot het morulastadium een halve dag post-coitum te transplanteren

naar oviducten van acceptoren (Fekete,1942; Tarkowski,1959). Blastocysten kunnen het best getransplanteerd worden naar de uterus van acceptoren, tweeënhalve dag post-coitum (Hogan,1986). De resultaten na transplantatie van tweecellige embryo's lopen in de literatuur sterk uiteen (zie Tabel 7.7)

Tabel 7.7: Transplantatieresultaten van tweecellige muize-embryo's

| Onderzoeker | # getransplanteerde embryo's | # foetussen en levend geboren nakomelingen |
|------------------|------------------------------|--|
| Tarkowski,1959 | 50 | 35 (70%) |
| Whittingham,1973 | 54 | 9 (17%) |
| Cross,1970 | 55 | 13 (24%) |
| Miyamoto,1972 | 80 | 10 (13%) |
| Kaufman,1973 | 78 | 42 (54%) |
| Mann,1988 | 48 | 26 (54%) |

De laatste auteur heeft ook embryo's, die ontstaan waren na micromanipulatie, getransplanteerd.

Zoals te zien in tabel 7.7 liggen de resultaten van de verschillende studies ver uiteen. In onze studie resulteerde 24% van de getransplanteerde embryo's in een levend geboren nakomeling. Een belangrijke reden voor het verschil in transplantatieresultaat kan de technische uitvoering van de transplantatie zijn. Andere variabelen zijn natuurlijk de status van de acceptormoeder en kwaliteit van de embryo's. Bij ons controle-experiment, waarbij 187 tweecellige embryo's (verkregen na in-vitro-inseminatie) getransplanteerd werden, werden 40 levende jongen geboren (21%) (tabel 7.3). Hierdoor lijkt het onwaarschijnlijk dat embryo's ontstaan na micromanipulatie kwalitatief minder goed zijn dan embryo's ontstaan na in-vitro-inseminatie.

Receptiviteit van de acceptormoeder als oorzaak van falen is te elimineren door naar het aantal geboren jongen te kijken per moeder met nakomelingen. Van de 53 getransplanteerde embryo's ontwikkelden zich 23 tot levende nakomeling (43%). Het aantal embryo's dat werd getransplanteerd bij moeders die nakomelingen kregen en bij moeders zonder nakomelingen is gelijk (5,9 versus 5,6) (tabel 7.3). Het aantal vrouwtjes dat geboren werd is iets hoger dan het aantal mannetjes (14 versus 9).

Bij de drie hierboven besproken experimenten was het bevruchtingspercentage na micro-inseminatie met 2-5 zaadcellen gelijk: experiment I: 49%, experiment II: 54%, experiment III: 46%.

In experiment IV bedroeg het aantal tweecellige embryo's 76% van het aantal geïnjecteerde eicellen. Er zijn factoren aanwijsbaar als reden van deze verbetering.

Het vierde experiment werd een half jaar na de eerste drie experimenten uitgevoerd. In dat half jaar was wel praktisch geoefend met de micro-inseminatie bij eicellen die overtalig waren bij andere experimenten. Op deze wijze kon verder geoefend worden met de micro-inseminatie en met de vervaardiging van de pipetten. Dat de vaardigheid was toegenomen blijkt uit het feit dat bij experiment IV geen enkele eicel meer beschadigd werd na micro-inseminatie. Grotere vaardigheid leidt tot minder beschadiging en een kortere tijdsduur dat gameten en embryo's zich buiten de broedstoof bevinden.

Een andere oorzaak kan liggen in het feit dat de zaadcellen bij experiment IV op

een andere wijze werden voorbehandeld. De epididymisfragmenten werden opgevangen in medium aangevuld met 15 volume % GPO i.p.v. 30 mg BSA/ml. Pas na een uur opzwellen werden de zaadcellen overgezet in medium met 30 mg BSA/ml. De lagere viscositeit van de GPO-oplossing laat de zaadcellen gedurende langere tijd hun motiliteit behouden dan de visceuze BSA-oplossing. Behoud van motiliteit kan een rol spelen bij het bevruchttingsproces, ook na micro-inseminatie (Barg,1986).

Uit het vierde experiment blijkt ook dat slechts 2,4% van de bevruchte eicellen door meer dan één zaadcel bevrucht wordt na micro-inseminatie. Ook blijkt dat van het totaal aantal tweecellige embryo's dat één dag na micro-inseminatie gezien wordt, 94 % uit eicellen met twee pronuclei ontstaan is. M.a.w. 6 % van de tweecellige embryo's is ontstaan uit niet op de juiste wijze bevruchte eicellen. Bij de eicellen waarbij 10 uur na micro-inseminatie geen pronuclei gezien zijn en die zich toch tot tweecelligen hebben ontwikkeld is het mogelijk dat de pronuclei bij inspectie al verdwenen zijn of nog moesten ontstaan. Ook is het mogelijk dat de embryo's parthenogenetisch ontstaan zijn. Eicellen die door meerdere zaadcellen bevrucht worden, zullen zich in het algemeen ook bij de muis wel verder delen. Het is echter zeer zeldzaam dat hier een volwaardig individu uit ontstaat. Het is ook bekend dat indien humane eicellen door twee zaadcellen bevrucht worden, in een later stadium (2 tot 8 cellig) een van de twee zaadcelpronuclei uit het cytoplasma verwijderd kan worden, waardoor toch een diploïd embryo ontstaat (Plachot,1987).

In de literatuur loopt het percentage triploïdie na in-vitro-inseminatie met muisgameten uiteen van 0.6 % (Donahue,1972) tot 6 % (Baumgartner,1988). De helft van deze triploïde embryo's ontstaat via dispermie van een oöcyt, de helft uit digynie d.w.z. een dubbele maternale chromosomale bijdrage aan het embryo (Donahue,1972). Het percentage triploïdie in ons experiment (2,4 % van alle bevruchte eicellen) is dus vergelijkbaar.

Dat behalve de zona ook de eicelmembraan een barrière voor polyspermie vormt heeft Wolf bewezen bij zijn experimenten met IVF bij zonavrijemuize-eicellen (Wolf,1978). Hij vond dat deze barrière tegen polyspermie afhankelijk is van het aantal geïnsemineerde zaadcellen. Ook na micro-inseminatie van meer dan één zaadcel blijkt dus slechts een klein aantal eicellen polyspermisch bevrucht te worden.

7.8 REFERENTIES

Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977; 61: 378-383.

Barg PE, Wahrman MZ, Talansky BE, Gordon JW. Capacitated, acrosome reacted but immotile sperm, when microinjected under the mouse zona pellucida, will not fertilize the oocyte. *J Exp Zool* 1986; 237: 365-374.

Baumgartner AP, Chrisman CL. Analysis of postimplantation mouse embryos after maternal heat stress during meiotic maturation. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 469-474.

Boot LM, Mühlbock O. The mammary tumor incidence in the C3H mouse strain. *Acta UCC* 1956; 12: 569-581.

SUBZONALE INSEMINATIE BIJ DE MUIS

Brinster RL. Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. *J Reprod Fertil* 1967; 13: 413-420.

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 4438-4442.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Tornos I. An improved culture medium supports development of random bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 679-688.

Cole RJ. Cinematographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morph* 1967; 17: 481-490.

Cross PC, Brinster RL. In vitro development of mouse oocytes. *Biol Reprod* 1970; 3: 298-307.

Cross PC, Brinster RL. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp Cell Res* 1973; 77: 57-62.

Donahue RP. Fertilization of the mouse oocyte: sequence and timing of nuclear progression to the two-cell stage. *J Exp Zool* 1972; 180: 305-318.

Fekete E, Little CC. Observations on the mammary tumor incidence of mice born from transferred ova. *Cancer Res* 1942; 2: 525-530.

Flash G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RAS, Bolton VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; 1: 681-686.

Fraser LR, Drury LM. Mouse sperm genotype and the rate of egg penetration in vitro. *J Exp Zool* 1976; 197: 13-20.

Gates AH. Rate of ovular development as a factor in embryonic survival. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). *Pre-implantation stages of pregnancy*. Boston, 1965; 270-288.

Hartshorne GM, Edwards RG. Role of embryonic factors in implantation: recent development. In 'Ballière's clinical Obstetrics and Gynaecology' 1991; 5: 133-158.

Hawlett SK, Bolton VN. Sequence and regulation of morpho-logical and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 175-206.

Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory 1986; 97-104.

Hoppe PC, Pitts S. Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol Reprod* 1973; 8: 420-426.

Iyengar MR, Iyengar CWL, Chen HY, Brinster RL, Bornslaeger E, Schultz RM. Expression of creatine kinase isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1983; 96: 263-268.

HOOFDSTUK 7

Lacham O, Trounson A, Holden C, Mann J, Sathananthan H. Fertilization and development of mouse eggs injected under the zona pellucida with single spermatozoa treated to induce the acrosome reaction. *Gamete Res* 1989; 23: 233-243.

Lassalle B, Courtot AM, Testart J. In vitro fertilization of hamster and human oocytes by microinjection of human sperm. *Gamete Res* 1987; 16: 69-78.

Lewis WH, Wright ES. On the early development of the mouse egg. *Contributions to embryology*. Carnegie Institute, Washington 1935; 25: 115-144.

Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38: 1077-1083.

McLaren A, Michie D. Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. *J Exp Biol* 1956; 33: 394-416.

McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature* 1958; 182: 877-878.

Miyamoto H, Chang MC. Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 135-137.

Perona RM, Wasserman PM. Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoblast. *Develop Biol* 1986; 114: 42-52.

Plachot M, Junca A-M, Mandelbaum J, de Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J. Chromosome investigations in early life. II. Human pre-implantation embryos. *Human Rep* 1987; 2: 29-35.

Quinn P, Harlow GH. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool* 1978; 206: 73-80.

Quinn P, Stanger JD, Whittingham DG. Effect of albumin on fertilization of mouse ova in vitro. *Gamete Res* 1982; 6: 305-313.

Talansky BE, Barg PE, Gordon JW. Ion pump ATPase inhibitors block the fertilization of zona-free mouse oocytes by acrosome-reacted spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 447-455.

Tarkowski AK. Experiments on the transplantation of ova in mice. *Acta Theriol* 1959; 2: 251-267.

Whitten WK. Culture of tubal ova. *Nature* 1957; 179: 1081-1082.

Whitten WK, Biggers JD. Complete culture of the preimplantation stages of the mouse in vitro. *J Reprod Fertil* 1986; 17: 399-401.

Whittingham DG. Fertilization, early development and storage of mammalian ova in vitro. In 'The early development of mammals'. Cambridge University Press, Cambridge, 1975.

Wolf DP. The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. *Develop Biol* 1978; 64: 1-10.

MICRO-INSEMINATIE BIJ DE MENS, EEN CONTROLESTUDIE: IN-VITRO-INSEMINATIE VERSUS MICRO-INSEMINATIE

8.1 INLEIDING

Voordat wij begonnen met de micro-inseminatie van menselijke eicellen waren reeds enige publikaties verschenen over dit onderwerp (zie ook hoofdstuk 6). Alhoewel de resultaten van de eerste studies uit 1987 en 1988 teleurstellen, zijn deze onderzoekers optimistisch over de toekomst van de micro-inseminatie (Bongso,1989; Laws-King,1987). Daarbij wordt meestal verwezen naar het moeizame begin van de allereerste IVF-behandelingen.

Het doel van ons onderzoek met micro-inseminatie bij de mens was om na te gaan of bevruchting via micro-inseminatie succesvoller is dan bevruchting via in-vitro-inseminatie. Een goed onderzoek kan verricht worden door binnen ieder patiëntenpaar een vergelijking te maken tussen micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie.

Een groep patiëntenparen die mogelijk met micro-inseminatie geholpen zou kunnen worden zijn de patiënten die eerder geen bevruchting verkregen met IVF (Steirteghem,1992).

Nadat de experimenten met de micro-inseminatie bij muize-eicellen succesvol beëindigd waren (zie hoofdstuk 7), hebben wij een verzoek gericht aan de Medisch Ethische Commissie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt om de micro-inseminatie bij menselijke eicellen toe te kunnen passen.

Voordat nieuwe onderzoeken of nieuwe therapieën bij patiënten in het AZR/Dijkzigt mogen worden toegepast moet namelijk altijd een onderzoeksprotocol ter toetsing aangeboden worden aan de Medisch Ethische Commissie van het Dijkzigt Ziekenhuis/AZR (MEC). Aangezien micro-inseminatie bij de mens een nieuwe methode van behandeling was in het Dijkzigt Ziekenhuis en de bruikbaarheid van deze techniek eerst op wetenschappelijke wijze getoetst moest worden bij de mens, was het noodzakelijk een protocol bij de MEC in te dienen.

De MEC vond het noodzakelijk dat dit protocol ter goedkeuring aangeboden zou worden aan de Kerncommissie Ethiek Medisch Wetenschappelijk Onderzoek van de Gezondheidsraad (KEMO). Deze Kerncommissie is ingesteld ten behoeve van Medisch Ethische Commissies die geconfronteerd worden met ethische vraagstukken die boven het niveau van de lokale commissie uitstijgen, en waarbij proefpersonen, embryo's of foetussen betrokken zijn.

In het vervolg van dit hoofdstuk zal eerst de aanvraag bij de Medisch Ethische Commissie behandeld worden, daarna wordt de patiëntselectie behandeld en daarna de uitvoering van het experiment, de resultaten en de conclusie.

8.2 Protocol ingediend bij de MEC en de KEMO: micro-inseminatie van eidellen bij andrologische en onverklaarbare bevruchtingsproblemen bij de mens.

J.J.C.M. van de Leur, A.Th. Alberda, G.H. Zeilmaker

8.2.1 Inleiding

Voor een verbetering van de bevruchtingsresultaten en een verhoging van de zwangerschapspercentages bij de IVF-behandeling, wordt in enkele centra de zgn. micro-inseminatie-methode ontwikkeld, een variatie op de veel toegepaste IVF-techniek. De laagste bevruchtingsresultaten bij IVF komen voor in de populatie patiënten waarbij sprake is van mannelijke in/sub-fertiliteit. De WHO spreekt van mannelijke infertiliteit indien het totaal aantal zaadcellen minder dan 20 miljoen/ml is en minder dan 40% van de zaadcellen bewegend is. Dit blijkt ook uit tabel 8.1 waar de embryo-ontwikkeling voor patiënten-groepen met verschillende aantallen motiele zaadcellen is bekeken.

Tabel 8.1: Embryo-ontwikkeling januari-juni 1987 IVF lab EUR

| motiele zaadcellen per ml ejaculaat | # patiënten | # pat. met embryo's | # doorgaand zwanger |
|--|-------------|---------------------|------------------------|
| 10x10 ⁶ | 21 | 11 (52%) | 1 (4%) |
| 20x10 ⁶ | 18 | 15 (83%) | 1 (6%) |
| 30x10 ⁶ | 30 | 25 (83%) | 5 (16%) |
| >30x10 ⁶ | 315 | 265 (84%) | 41 (13%) |

Uit deze tabel blijkt dat patiënten met minder dan 10 miljoen motiele zaadcellen/ml 52% kans hebben op de vorming van een embryo. Veel patiënten met slechte zaadcelparameters worden daarom nu afgewezen voor IVF vanwege de geringe kans op succes. Van alle patiënten, die wel behandeld worden, heeft 15% één of meerdere malen geen bevruchting van de eicellen bij een IVF-poging. Dit betekent voor het Dijkzigt-ziekenhuis dat van de ongeveer 1000 behandelingen per jaar er 150 behandelingen zijn waarbij geen embryo's ontstaan.

Bij patiënten met bevruchtingsproblematiek passeert de zaadcel gemakkelijk de laag cumuluscellen, die om de eicel ligt, maar niet de eischil (de zona pellucida). De zona vormt dan een barrière voor de zaadcel, die deze niet kan passeren.

De oorzaak hiervoor moet in de zaadcel zelf gezocht worden, de passage van de zona is zowel een mechanisch als chemisch proces. Na aanhechting van de zaadcel aan de zona via een receptorbinding dringt de zaadcel met zijn kop als beitel en de staart als aandrijvingsmechanisme door de zona. Bij veel andrologische patiënten is de motiliteit van de zaadcellen gestoord, de voorwaartse snelheid van de zaadcel is te laag of de bewegingen van de zaadcellen zijn niet gecoördineerd zodat de zona niet gepasseerd kan worden.

Als chemisch hulpmiddel bezit de zaadcel een membraan om zijn kop, het acrosoom, gevuld met enzymen als hyaluronidase, acrosine en esterases om de bindingen in de zona te verbreken. Het vrijkomen van deze enzymen uit het acrosoom, de zgn.

acrosoomreactie, is nodig zodat daarop de enzymen de zona pellucida kunnen lyseren. Bij de passage van de zona verliest de zaadcel zijn acrosoom en pas daarna kan de eigenlijke bevruchting, de samensmelting van zaadcel en eicel, plaatsvinden.

Hyaluronidase is verantwoordelijk voor het uiteenvallen van de cumulus gedurende de kweek van de eicellen bij IVF. Zestien uur na de inseminatie van de kweek zijn de cumuluscellen voor het grootste deel losgeweekt van de eicel zodat deze vrij komt te liggen.

Bij sommige andrologische patiënten bezitten de zaadcellen geen acrosoom en is penetratie van de zona niet mogelijk. Hulp aan deze zaadcellen bij de passage van de zona pellucida d.m.v. de micro-inseminatie zou deze problemen wellicht verhelpen. In het buitenland zijn inmiddels met deze behandelmethode enkele zwangerschappen ontstaan.

8.2.2 Technische uitvoering van de micro-inseminatie

Eicellen, zoals ze opgespoord worden in het IVF-laboratorium, zijn omgeven door een wolk van cumuluscellen. Deze cellen worden verwijderd met behulp van het door bestraling gesteriliseerde enzym hyaluronidase (Hyason^R, Organon). Het zaadmonster ondergaat dezelfde behandeling als voor een routine IVF-behandeling d.w.z. 2 maal wassen met medium om de seminale vloeistof kwijt te geraken door middel van centrifugering, gevolgd door het opzwellen van de levende zaadcellen vanuit de pellet. Na 4 uur worden de opgezwommen zaadcellen overgebracht in een druppel medium onder olie. In dit petrischaaltje bevindt zich een tweede druppel waarin de eicel wordt overgezet.

Met behulp van een zeer dunne glazen pipet (5-10 µm) met scherpe punt worden morfologisch goede, meest progressief beweeglijke zaadcellen uit de zaaddruppel opgezogen. In de andere druppel wordt de eicel aan een iets bredere (50 µm) glazen pipet vastgezogen. Daarna wordt m.b.v. de injectiepipet de zona pellucida aangeprikt en worden de zaadcellen uitgeblazen in de perivitelline ruimte. Alleen zaadcellen zonder acrosoom kunnen de zonavrije eicel bevruchten en aangezien bekend is dat 20 tot 30% van de zaadcellen hun acrosoom spontaan verliest in vitro worden er drie zaadcellen ingebracht. Met de inseminatie van 3 zaadcellen is er vermoedelijk voldoende kans dat een acrosoomvrije zaadcel onder de zona wordt gebracht.

De methode bestaat dus in principe uit mechanische hulp bij het binnendringen van de eischil door de zaadcel. Alle werkzaamheden zijn identiek aan die bij een routinematige IVF-behandeling, behalve de hyaluronidase-behandeling van de eicel en het aanprikken van de zona pellucida.

8.2.3 Risico-analyse

1. Uit dierexperimenteel onderzoek is gebleken dat micro-inseminatie bij proefdieren een veilige bevruchtingsondersteunende methode is. Onderzoekers hebben bij de muis geen verschil gevonden in aantallen en morfologische kenmerken tussen via IVF of via micro-inseminatie verkregen embryo's. Ook blijkt uit Tabel 8.2 dat het aantal nakomelingen normaal is na transfer van d.m.v. micro-inseminatie verkregen muize-embryo's en dat al deze muizen gezond waren. Na transplantatie van 89 embryo's zijn

er tot nu toe bij onze eigen onderzoeken (juni 1990) 23 (26%) gezonde nakomelingen geboren. Van deze nakomelingen zijn er tot nu toe twee paren onderling gekruist met als resultaat 15 nakomelingen (8 vrouwtjes en 7 mannetjes).

Tabel 8.2. Aantal levende nakomelingen na transplantatie van d.m.v. micro-inseminatie verkregen muize-embryo's

| Onderzoeker | # getransplanteerde embryo's | # muizen geboren |
|-----------------|------------------------------|------------------|
| Gordon (1986) | 79 | 29 (36%) |
| Mann (1988) | 48 | 26 (54%) |
| Depypere (1988) | 217 | 87 (40%) |
| Odawara (1989) | 40 | 14 (35%) |

Zowel in onze studie als in alle overige studies werden de nakomelingen alleen morfologisch anatomisch onderzocht, hierbij werden geen afwijkingen gevonden. Deze studies bestuderen alleen de veiligheid bij het proefdier, voor een studie van de veiligheid van de methode bij de mens bestaat behalve een directe toepassing bij patiëntenparen geen mogelijkheid (zie ook 'risico-analyse'nr. 3).

2. Uit publikaties waarbij gezonde kinderen zijn geboren na toepassing van de micro-inseminatie blijkt dat deze methode geen schade toebrengt aan het genetisch materiaal van eicel of zaadcel (Malter,1989 en Bongso,1989). Het in deze publikaties beschreven aantal kinderen is echter nog te laag om zekerheid te geven.

3. De meeste onduidelijkheid betreft de invloed op het genetisch materiaal bij de toepassing van nieuwe voortplantingstechnieken. In deze paragraaf willen wij hierover een nadere uiteenzetting geven.

Van de menselijke voortplanting is bekend dat een groot aantal van de op natuurlijke wijze ontstane embryo's implanteert maar daarna voortijdig verloren gaat.

Wilcox et al (Wilcox,1988) vonden in een groep vrouwen, die zonder medische hulp zwanger konden worden, per cyclus een risico van 22% verlies van het embryo voordat een zwangerschap klinisch vastgesteld kon worden en een risico van 9% op een spontane abortus per cyclus. Tezamen is dit 33% bij een groep vruchtbare vrouwen per cyclus. Van de spontane abortussen is bekend dat 60% chromosomaal afwijkend is (Schlesselman,1979), van een voortijdig verloren embryo is de chromosomale inhoud natuurlijk niet meer te bestuderen.

Bij IVF is dit wel mogelijk. Er is namelijk bekend dat van alle bij IVF ontstane menselijke embryo's 11% van de gelijkmatig delende embryo's chromosomaal afwijkend is. Bij de embryo's waarbij celfragmenten aanwezig zijn, is 10 tot 37% afwijkend (Plachot, 1987a en 1987b). Deze embryo's worden ook getransplanteerd naar de baarmoeder van de IVF-patiënten.

Bij de kinderen geboren via in-vitro-fertilisatie komen niet meer chromosomale afwijkingen voor dan in de gehele populatie geboren kinderen, nl. 0,3% na IVF (Edwards,1985) versus 0,6% na een natuurlijke bevruchting (Nielsen,1975). De getransplanteerde embryo's met chromosoomafwijkingen leiden kennelijk niet tot het ontstaan van kinderen.

Studies van abortusmateriaal en IVF-embryo's laten dus zien dat bij de mens veel embryo's genetisch afwijkend zijn. Schlesselman berekende dat in vivo 30 tot 40% van

de geïmplanteerde blastocysten chromosomaal afwijkend is, maar dat meer dan 99% van deze blastocysten in een vroeg stadium van de zwangerschap verloren gaat. Chromosomaal afwijkende embryo's groeien zelden uit tot een voldragen foetus.

Indien micro-inseminatie chromosomale afwijkingen zou induceren, wat gezien de internationale ervaringen zeer onwaarschijnlijk is, zullen deze embryo's niet tot voldragen zwangerschappen leiden. Chromosomaal onderzoek van na micro-inseminatie ontstane embryo's is om deze reden en om onderstaande redenen niet zinvol.

Chromosomale afwijkingen in het embryo zijn zeer moeilijk aan te tonen daar de bewerking voor een analyse vaak leidt tot degeneratie van het embryo voordat de chromosomale analyse te maken is (bovendien zijn de onderzochte embryo's na de bewerking niet levensvatbaar meer).

Vele embryo's zullen onderzocht moeten worden om tot een statistisch significant verschil te komen tussen chromosomale afwijkingen die 'spontaan' of via IVF ontstaan en chromosomale afwijkingen die door micro-inseminatie ontstaan. Zal in een volgende via micro-inseminatie ontstane groep embryo's tot transplantatie van deze embryo's besloten worden omdat er geen significant verschil werd gevonden, dan zullen nog steeds chromosomaal afwijkende embryo's teruggeplaatst worden (10-37% van alle embryo's). (*Addendum*: Een studie van Kola, juli 1990, laat zien dat 4 van de 18 (22%) embryo's die gemicro-insemineerd werden met zaad van andrologische patiënten chromosomaal afwijkend waren, versus 9 van de 30 (30%) embryo's die op conventionele wijze met het zaad van een vruchtbare man werden geïnsemineerd, de percentages afwijkende embryo's zijn ongeveer gelijk. Wel moet gezegd worden dat de totaal aantallen laag zijn voor een statistisch significante uitspraak, maar deze kan alleen verkregen worden als honderden embryo's bestudeerd worden (Kola, 1990)).

4. Een goede selectie van de embryo's die d.m.v. micro-inseminatie verkregen zijn is wel te maken door de embryo's op morfologische kenmerken te selecteren en de gelijkmatig delende embryo's te verkiezen bij de embryo-transfer. Plachot heeft laten zien dat gelijkmatig delende embryo's veel minder vaak chromosomaal afwijkend zijn dan embryo's die celfragmenten bezitten (Plachot, 1987a). De kans op zwangerschap na transplantatie van gelijkmatig delende embryo's is groter dan na transplantatie van de zgn. gefragmenteerde embryo's. Deze selectie wordt op het IVF-laboratorium dan ook uitgevoerd door ervaren medewerkers.

5. Omdat de huidige technieken ontoereikend zijn, zal van een getransplanteerd embryo altijd onbekend zijn wat zijn chromosomale status is. Pas na implantatie is een verantwoord en betrouwbaar onderzoek uit te voeren. Om een geïmplanteerde embryo te onderzoeken zal de ouders een chorion villus sampling (vlokkentest) aangeboden worden. Daar deze ingreep niet geheel zonder risico is voor de foetus en een extra medische ingreep voor de moeder betekent, heeft de patiënte de vrije keus om dit onderzoek te ondergaan.

6. Door een structureel echografisch onderzoek van enkele belangrijke orgaan-systemen (hart, nieren en centraal zenuwstelsel), uitgevoerd door de afdeling obstetrische echografie o.l.v. Prof. Dr J.W. Wladimiroff, kan de foetale ontwikkeling bestudeerd worden. Hoewel minder ingrijpend bepaalt de patiënte ook hier of dit onderzoek zal plaatsvinden.

7. De ouders van een geboren kind zal geadviseerd worden om het kind neonataal en na 1 jaar te laten onderzoeken door een kinderarts. Later zal het dan via epidemiologisch onderzoek mogelijk zijn om gevonden afwijkingen te wijten aan de micro-

inseminatie of aan een andere factor.

8. Het gebruik van hyaluronidase bij menselijke eicellen is eerder bestudeerd. Afwijkingen zijn hierbij niet ontstaan (Mahadevan,1985 en Lavy,1988). Onderzoek bij proefdieren laat eveneens zien dat aangeboren afwijkingen na micro-inseminatie of hyaluronidasegebruik niet worden gezien (Mann,1988). Wij hebben met deze methode bij de muis tot nu toe (mei 1990) 15 levende nakomelingen verkregen, die alle gezond waren en zonder afwijkingen. Hyaluronidase wordt in een fysiologische concentratie gebruikt, d.w.z. de enzymconcentratie is dezelfde als in de seminale vloeistof (0,01 gewichtsprocent) (Savion,1986). Door middel van heen en weer pipetteren van de eicel met de cumuluscellen in de hyaluronidase-oplossing worden deze cellen verwijderd. Daarna wordt de eicel drie maal schoon gespoeld in kweekmedium.

9. Onbekend is het percentage genetisch afwijkende zaadcellen bij een andrologische patiënt. Wel is bekend dat vruchtbare mannen genetisch afwijkende zaadcellen bezitten die ook kunnen bevruchten (Martin,1987 en Brandriff,1988) en dat minder beweeglijke zaadcellen even vaak chromosomale afwijkingen hebben als de snelste zaadcellen (Brandriff,1986). Ook is bekend dat het fenotype van een zaadcel niet overeenkomt met zijn genotype. Een zaadcel kan een eicel niet bevruchten omdat hij een afwijkend acrosoom bezit, een abnormaal patroon van beweging heeft, de benodigde energie voor bevruchting ontbeert of de receptoren mist die nodig zijn voor de zaadcel-zona pellucida binding. Deze afwijkingen ontstaan tijdens de rijping van de spermatide tot spermatozoa die plaatsvindt in de testis en de epididymis. Voordat deze rijping begint vinden de meiotische delingen plaats waarbij een spermatogonium zich deelt tot 4 spermatiden en het genotype van de zaadcel bepaald wordt. Een afwijkende meiotische deling heeft dan ook geen samenhang met het fenotype van de zaadcel (Braun,1989).

10. Daar er drie zaadcellen onder de zona geïnsemineerd worden is er een kans op polyspermie, d.w.z. het binnendringen van meer dan één zaadcel in de eicel. Polyspermie komt ook bij de normale IVF-behandeling voor. Ten einde het transplanteren van mogelijk triploïde embryo's te voorkomen worden bij de normale IVF-behandeling alle embryo's zorgvuldig op de afwezigheid van polyspermie geïnspecteerd. Dit zal bij dit onderzoek ook gebeuren.

11. Om de techniek van micro-inseminatie, speciaal de doordringbaarheid van de eischil, bij menselijke eicellen te bestuderen, werd het volgende model gekozen. Tien eicellen die bij een IVF-poging niet bevrucht raakten, werden drie dagen in kweek gehouden zodat de onbevruchte status van deze eicellen bewezen was. M.b.v. de micro-injectiepipet konden zaadcellen (van de partner) in de ruimte tussen de eicel en de eischil achtergelaten worden. Uiteraard trad geen bevruchting op en ontstonden er geen embryo's. Wel werd bewezen dat de eischil gepasseerd kon worden en dat de 'onbevruchtbare' eicel niet werd beschadigd door de techniek.

8.2.4 BEHANDELING

1. Patiënten die aan een IVF-behandeling deelnemen op grond van een andrologische indicatie (minder dan $10 \cdot 10^6$ beweeglijke zaadcellen/ml) of die bij de voorafgaande poging geen enkele eicel met bevruchting hadden, wordt toestemming gevraagd om deel te nemen aan dit onderzoek. In een gesprek zal door de onderzoeker toestem-

ming van de patiënten gevraagd worden en het protocol toegelicht worden. De patiënten zullen na dit gesprek een 'informed consent' formulier meekrijgen, waarin de procedure uitgelegd wordt en hun handtekening wordt gevraagd indien zij instemmen met de behandeling. Voorgesteld wordt om 25 paren te laten deelnemen aan een pilotstudie om de effectiviteit van de behandeling te beoordelen, voor een beoordeling van eventuele negatieve gevolgen zou een veel grotere groep nodig zijn.

2. De helft van de eicellen wordt met de micro-inseminatie behandeld zoals beschreven in het hoofdstuk 'technische uitvoering van de micro-inseminatie'. Bij de andere helft van de eicellen, die conventioneel geïnsemineerd worden, wordt de cumulus niet verwijderd en worden eicellen en zaadcellen in dezelfde kweekdruppel gebracht.

3. Na 18 uur wordt gekeken of de eicellen inderdaad op de juiste manier zijn bevrucht d.w.z. dat er twee pronuclei aanwezig zijn. De daaropvolgende dagen wordt gekeken naar delingsstadia en doorgroei van het embryo.

4. Voor transplantatie worden embryo's gekozen uit de groep van de conventionele inseminatie of uit de groep van de micro-inseminatie. De groep met het grootste aantal embryo's heeft de voorkeur. Nooit worden embryo's uit beide groepen gelijktijdig teruggeplaatst, omdat dan van een ontstane zwangerschap niet geëvalueerd kan worden uit welke groep embryo's het kind afkomstig is. Verwacht kan worden, gezien de voorgeschiedenis van deze patiënten, dat de meeste embryo's ontstaan in de groep van de micro-inseminatie. De overige embryo's worden per groep ingevroren, zodat van ieder ontdooid embryo bekend is op welke manier de inseminatie heeft plaatsgevonden. Met de ingevroren embryo's kan in een volgende cyclus alsnog geprobeerd worden om een zwangerschap tot stand te brengen.

5. Bevruchtingsresultaten van de micro-inseminatie zullen per patiëntenpaar vergeleken worden met de bevruchting na een gewone in-vitro-inseminatie bij deze patiënten. Het zal duidelijk zijn dat deze behandeling voor het betreffende paar zowel een diagnostische waarde als een mogelijk therapeutische betekenis heeft.

6. Aan alle deelnemende paren wordt een vervolgonderzoek van de zwangerschap aangeboden, d.w.z. een chorion villus sampling en echografisch onderzoek en een pediatrisch onderzoek van het kind.

8.2.5 Informed consent formulier

Geachte Mevrouw en Meneer,

Hierbij willen we u vragen deel te nemen aan een nieuwe behandelingsmethode en een onderzoeksprotocol geheten: 'micro-inseminatie van eicellen'. Als u volledig akkoord gaat met de inhoud en doel van dit onderzoek willen we u vragen onderstaande verklaring te ondertekenen.

Voor dit onderzoek vragen wij aan patiënten, bij wie bij een vorige IVF-poging geen bevruchting plaatsvond, toestemming om de helft van het aantal eicellen te mogen behandelen m.b.v. de micro-inseminatie. Hierbij wordt met een dunne glazen pipet de schil van de eicel aangeprikt en drie zaadcellen in de ruimte tussen de eicel en haar schil gebracht. Eicel en zaadcel zijn dan zo dicht bij elkaar gebracht dat we hopen op meer kans op een bevruchting. We brengen meer dan één zaadcel onder de eischil

daar niet alle zaadcellen een eicel kunnen bevruchten.

We behandelen de helft van het aantal eicellen m.b.v. de micro-inseminatie, de overige eicellen proberen we op de normale IVF-wijze te bevruchten. Zo is het voor ons mogelijk een vergelijking te kunnen maken tussen de nieuwe techniek en een routine IVF-poging. Een nieuwe techniek is natuurlijk alleen zinvol als hij een beter resultaat geeft.

Mochten er in beide groepen van de eicellen embryo's ontstaan, dan kiezen we bij het overzetten van de embryo's naar de baarmoeder (de embryo-transfer) voor de mooiste embryo's uit de groep met het beste bevruchtingsresultaat (de overige embryo's worden ingevroren). Wij willen namelijk graag weten welke embryo's tot een zwangerschap leiden en de zwangerschap kunnen vervolgen.

Omdat deze nieuwe techniek voornamelijk bij proefdieren gebruikt is, zijn er nog geen bewijzen dat deze techniek bij de mens geheel veilig is. Hoewel er op theoretische gronden geen schade verwacht kan worden en elders reeds enkele gezonde kinderen geboren zijn via deze methode, kunnen we u geen volledige veiligheid garanderen.

Om een zwangerschap te kunnen controleren is er de mogelijkheid om een zgn. vlokcentest te laten uitvoeren. Hierbij wordt met een dunne naald door buikwand en de baarmoeder geprikt onder geleide van echoscopie, waarna het mogelijk is om enig weefsel op te zuigen van de moederkoek. Daaruit kan men de chromosomale samenstelling van het embryo vaststellen. Met deze methode bestaat een zeer kleine kans op schade voor het embryo, daarom zal een vlokcentest alleen uitgevoerd worden indien u dat wenst.

In een later stadium kan de groeiende foetus echografisch onderzocht worden, hierbij wordt gekeken naar de aanleg van het hart, de daaruit ontspringende bloedvaten, de hersenholten, de nieren en de blaas. Dit onderzoek is uiteraard veel minder belastend voor u en het kind en risicovrij.

Als het kind geboren is willen we u vragen of u instemt dit te laten onderzoeken door een kinderarts, net na de geboorte en na één jaar. Voor u biedt dit een extra mogelijkheid tot gedegen onderzoek van uw kind, voor ons de mogelijkheid tot registratie van de geboren kinderen zodat er in de toekomst een bewijs verkregen kan worden over de veiligheid van de micro-inseminatie.

J.J.C.M. van de Leur
Afdeling Groei, Endocrinologie en Voortplanting
Erasmus Universiteit Rotterdam

MICRO-INSEMINATIE BIJ DE MENS

Verklaring

Hierbij verklaren wij dat wij bereid zijn om de helft van het aantal eicellen wat bij onze eerstkomende IVF-punctie gevonden wordt, te laten behandelen d.m.v. micro-inseminatie. Ook verklaren wij bovenstaande gelezen en begrepen te hebben,

NAAM

DATUM

HANDTEKENING

(vrouw)

(man)

Bovenstaand protocol werd op 24 augustus 1990 aanvaard door zowel de MEC van het AZR/EUR als de KEMO. Na goedkeuring door beide commissies werd overgegaan tot de patiëntenselectie.

8.3 Patiëntenselectie

De totale groep patiënten die de behandeling mocht ondergaan bedroeg 25 paren. Om de kans op een IVF-punctie en daarmee ook de uitvoering van de micro-inseminatie zo groot mogelijk te maken zijn patiëntenparen gekozen die reeds één of meerdere IVF pogingen ondergaan hadden. De geselecteerde patiënten hadden bij deze IVF-poging of pogingen nog nooit bevruchting verkregen. Bevruchting werd gedefinieerd als de aanwezigheid van pronuclei 16 uur na de inseminatie en het doordelen van eicellen 48 uur na inseminatie, ook als geen pronuclei gezien waren. Bij geen van deze patiënten had derhalve transplantatie van embryo's plaatsgevonden. Een selectie van patiëntenparen die reeds IVF ondergaan hadden, maakte het meer aanvaardbaar om deze patiënten een IVF behandeling aan te bieden met gebruik van een nieuwe techniek dan aan patiëntenparen die nooit eerder IVF ondergaan hadden.

Alle benaderde patiëntenparen hadden zelf verzocht om verder behandeld te kunnen worden middels IVF, ondanks teleurstelling bij eerdere pogingen.

Om een goede vergelijking tussen in-vitro-inseminatie en micro-inseminatie te kunnen maken, moesten bij de voorafgaande IVF-pogingen voldoende aantallen eicellen verkregen zijn. Dit maakte de kans groter dat bij een volgende hyperstimulatie opnieuw voldoende eicellen gevonden zouden worden. Als grens werd een minimum van zes eicellen bij één van de voorafgaande puncties genomen. Uit de Rotterdamse IVF cijfers van de afgelopen jaren is namelijk bekend dat patiënten met lage aantallen eicellen ook een geringere kans op bevruchting hebben.

Patiënten met een azoöspermie werden uitgesloten. Andere grenzen aan zaadcel-aantallen of -motiliteit werden niet gesteld. Zaadcelmorfologie en de aanwezigheid van antilichamen tegen zaadcellen werden buiten beschouwing gelaten.

Patiënten moesten altijd zelf met het verzoek komen voor verdere IVF-behandelingen voordat zij benaderd werden om mee te doen aan het onderzoek. De behandelend artsen meldden aan de patiënten dat zij benaderd zouden worden om aan het onderzoek deel te nemen. Daarna nam de onderzoeker contact op met deze patiënten

HOOFDSTUK 8

en maakte een afspraak voor een informatief gesprek. De patiënten kregen schriftelijke informatie mee en een instemmingsverklaring ter ondertekening. Patiënten die deel wilden nemen stuurden de verklaring getekend retour. Alle benaderde paren gingen akkoord.

In tabel 8.3 staan de resultaten van de voorafgaande IVF pogingen van de 25 patiëntenparen vermeldt.

TABEL 8.3: Gegevens van de patiëntenparen die voor micro-inseminatie geselecteerd werden

| | patiënten met één punctie | patiënten met twee puncties | Students T-test |
|--|------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| aantal patiënten | 12 | 13 | |
| gem. leeftijd vrouw | 31,7 ± 4,6 | 33,2 ± 4,3 | p=0,409 |
| gem. leeftijd man | 34,7 ± 6,4 | 41,2 ± 6,0 | p=0,016 |
| punctie 1 | | | |
| gem. aantal eicellen | 12,0 ± 5,7 | 9,7 ± 6,6 | p=0,375 |
| totaal aantal zaadcellen x 10 ⁶ /ml | 19,3 ± 9,9 | 37,7 ± 27,7 | p=0,04 |
| aantal bewegende zaad- cellen x 10 ⁶ /ml | 7,3 ± 5,7 | 28,0 ± 26,0 | p=0,015 |
| % motiliteit | 63% ± 17 | 37% ± 30 | p=0,013 |
| punctie 2 | | | |
| gem. aantal eicellen | - | 7,7 ± 3,0 | p=0,315 ¹ |
| totaal aantal zaadcellen x 10 ⁶ /ml | - | 45,8 ± 36,1 | p=0,528 ¹ |
| aantal bewegende zaad- cellen x 10 ⁶ /ml | - | 38,1 ± 35,9 | p=0,418 ¹ |
| % motiliteit | - | 31% ± 28 | p=0,565 ¹ |

¹Vergelijking tussen eerste behandeling en tweede behandeling bij patiënten met twee voorafgaande puncties (tussen punctie 1, kolom 3 en punctie 2, kolom 3)

8.4 UITVOERING

Voor het verkrijgen van de eicellen onderging de vrouw een ovariële hyperstimulatie gevolgd door een ovulatie-inductie. Vanaf de derde dag van de menstruele cyclus kreeg de vrouw dagelijks 225 I.E. HMG (Humegon[®], Organon, Oss, Nederland) toegediend. Vanaf de achtste cyclusedag werd de groei van de ovariële follikels m.b.v. vaginale echoscopie gevolgd. De patiënten ontvingen 225 I.E. HMG totdat de grootste follikels een gemiddelde diameter van 17 à 18 mm bereikt hadden. Op die dag werd een éénmalige HCG gift van 10.000 I.E. (Pregnyl[®], Organon, Oss, Nederland) toegediend. Dit werd 35 uur later gevolgd door een vaginale punctie, onder echografische controle, van de follikels.

In het laboratorium werden de eicellen uit de punctaten geïsoleerd en in druppels medium onder minerale olie in de broedstoof geplaatst. Al deze handelingen en

de verdere routine IVF-procedure vonden plaats zoals reeds eerder beschreven (Zeilmaker, 1986).

Na isolatie werden de eicellen aselekt verdeeld over twee groepen. Indien er minder dan zes eicellen gevonden werden, werden alle eicellen gebruikt voor micro-inseminatie.

Na de vaginale punctie werd de man gevraagd zaad te produceren. Na de liquefactie van het semen werden bewegende en niet-bewegende zaadcellen geteld, het semen-volume gemeten en werd het semenmonster via de Percoll-methode verwerkt (voor Percoll-methode zie hoofdstuk 5). Indien er minder dan 100.000 bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat werden geteld werd alleen micro-inseminatie toegepast.

Vier tot zes uur na isolatie werd één van de twee groepen eicellen behandeld in een hyaluronidase-oplossing (Hyason[®], Organon, Oss, Nederland). Ampullen Hyason werden voorafgaand aan het gebruik gesteriliseerd m.b.v. gamma-straling. Daarna werd één ampul met 150 I.U. Hyason opgelost in 1 ml van het IVF-medium. De cumuluswolken werden diverse malen heen en weer gepipetteerd in de oplossing totdat het merendeel van de cumuluscellen losgeweekt was van de eicel. De 'kale' eicel werd schoongespoeld in drie druppels vers medium en in de broedstoof geplaatst. De totale duur van het 'kaalmaken' van de eicellen bedroeg minder dan 5 minuten.

Het opgezwommen semenmonster werd verdeeld over twee fracties. De overgebleven groep eicellen met cumuluswolk werd geïnsemineerd met één fractie zoals bij een normale IVF-procedure, d.w.z. gemiddeld werden er 50.000 tot 100.000 zaadcellen uit het semenmonster aan iedere eicel toegevoegd.

Na de verwijdering van de cumuluscellen werd begonnen met de micro-inseminatie. De fixatiepipet (uitwendige diameter $\pm 50 \mu\text{m}$, inwendige diameter $\pm 10 \mu\text{m}$) en de injectiepipet (uitwendige diameter $\pm 15 \mu\text{m}$, inwendige diameter $\pm 7 \mu\text{m}$) werden vervaardigd zoals beschreven in het hoofdstuk 7).

Micro-inseminatie vond plaats in het standaardmedium, in een kweekschachtje met druppels onder olie. Eén druppel bevatte de zaadcellen en één druppel de cumulus-vrije eicellen, met een maximum van 5 eicellen per druppel. In de injectiepipet werden ongeveer 20 tot 30 goed bewegende zaadcellen uit de zaaddruppel opgezogen. Daarna werd de eicel vastgezogen met de fixatiepipet, zodanig dat het poollichaampje op de positie van 12 uur lag. Door aanzuigen van de eicel werd de zona aangespannen, waardoor de injectiepipet gemakkelijk door de zona sneed. De injectie geschiedde op de positie van 1 à 2 uur. Na injectie werden 2 tot 5 zaadcellen in de perivitelline ruimte geblazen. De injectiepipet werd teruggetrokken en de zona sloot zich onmiddellijk achter de injectiepipet. Micro-inseminatie van vijf eicellen nam ongeveer 1 minuut in beslag.

Na het vrijmaken van de cumulus konden de eicellen beoordeeld worden op hun status. Eicellen die nog één kiemblaasje bezaten of waarbij geen eerste poollichaampje aanwezig was, eicellen die de metafase II nog niet bereikt hadden, werden als onrijp beschouwd. Pogingen tot micro-inseminatie bij deze eicellen leidden tot snelle degeneratie, doordat er geen ruimte aanwezig was tussen eicel en zona pellucida. Na de micro-inseminatieprocedure werd het kweekschachtje snel teruggeplaatst in de broedstoof.

De volgende ochtend werden de eicellen geïnspecteerd op pronucleusvorming. Eicellen met twee pronuclei uit de micro-inseminatie groep en uit de in-vitro-inseminatiegroep werden apart gehouden.

HOOFDSTUK 8

Voor embryotransplantatie, 2 of 3 dagen na de punctie, werden de embryo's geïnspecteerd. Voor transplantatie werden de embryo's gekozen uit die inseminatiegroep waarin zich de meeste en best ogende embryo's bevonden. Nooit werden embryo's uit beide groepen tegelijk teruggeplaatst.

8.5 RESULTATEN

Van de 25 patiëntenparen waren er 17 waarbij micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie vergeleken konden worden. In Tabel 8.4 staan de resultaten van deze 17 patiënten vermeld. In deel A van Tabel 8.4 de resultaten naar het aantal patiënten en in deel B de resultaten naar het aantal eicellen en embryo's.

Tabel 8.4: Vergelijking micro-inseminatie met in-vitro-inseminatie

Deel A: Patiënten waar micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie vergeleken konden worden (n=17).

| # patiënten | bevruchting met micro-inseminatie | in-vitro-inseminatie. |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 5 | + | + |
| 1 | + | - |
| 2 | - | + |
| 9 | - | - |

McNemar-test $p=1,00$, n.s.

Transplantatie van embryo's bij de patiënten waar een vergelijking tussen micro-inseminatie. en in-vitro-inseminatie. mogelijk was

| transplantatie van | # patiënten | # zwangeren |
|------------------------|-------------|-------------|
| in-vitro-ins. embryo's | 6 | 1 |
| micro-ins. embryo's | 2 | 0 |

Deel B: Aantallen eicellen en embryo's bij puncties waarbij micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie vergeleken konden worden.

| | micro-inseminatie | in-vitro-inseminatie |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| # oöcyten | 103 | 106 |
| # embryo's | 11 (10,7%) ¹ | 24 (22,6%) ¹ |
| # onrijpe oöcyten | 14 (13,6%) | - |
| # polyspermie | 1 (1%) | 0 |

¹ $\chi^2=4,537$, $p=0,03$

Van de zeventien patiëntenparen waren er vijf die zowel met micro-inseminatie als met in-vitro-inseminatie bevruchting hadden. Eén patiënt had alleen bevruchting met micro-inseminatie, twee patiënten alleen met in-vitro-inseminatie en negen

MICRO-INSEMINATIE BIJ DE MENS

patiënten hadden geen bevruchting.

Bij deze zeventien patiënten ondergingen 103 eicellen micro-inseminatie, hieruit ontstonden 11 embryo's (10,7%), 14 eicellen bleken onrijp te zijn (13,6%) en één eicel vertoonde polyspermie. Van de 106 in-vitro-inseminatie eicellen werden er 24 bevrucht (22,6%). Het verschil in aantallen embryo's, 11 versus 24, is statistisch significant ($p < 0,05$).

Van de acht patiënten die alleen met micro-inseminatie werden behandeld (zeven wegens een eicelaantal lager dan zes, één wegens een zaadcelconcentratie lager dan 100.000/ml) waren er slechts twee patiënten met bevruchting. Deze acht patiënten hadden 41 eicellen waaruit 4 embryo's ontstonden (9,8%), 3 eicellen bleken onrijp (7,3%) en 2 eicellen waren door meer dan één zaadcel bevrucht (4,8%).

Alle eicellen behandeld met micro-inseminatie, zowel in de groep waar een vergelijking mogelijk was als in de groep waar alleen micro-inseminatie mogelijk was, die 18 uur na micro-inseminatie twee pronuclei vertoonden, deelden ook door. Alle bevruchte eicellen groeiden uit tot embryo's.

Bij twee patiënten waren er meer embryo's van betere kwaliteit na micro-inseminatie dan na in-vitro-inseminatie. In totaal waren er vier patiënten met een transplantatie van micro-inseminatie embryo's, resp. één patiënt kreeg één embryo getransplanteerd, twee patiënten kregen twee embryo's getransplanteerd en één patiënt drie embryo's. Geen van deze patiënten werd zwanger.

Er waren 6 patiënten waarbij in-vitro-inseminatie embryo's getransplanteerd werden, één patiënt werd zwanger.

In Tabel 8.5 staan de gegevens vermeld van de patiënten die wel en de patiënten die geen bevruchting behaalden met micro-inseminatie.

Tabel 8.5: vergelijking tussen patiënten mét en zònder bevruchting m.b.v. micro-inseminatie (n=25)

| | Bevruchting met micro-inseminatie | Geen bevr. met micro-inseminatie | Students T-test |
|---|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| # patiënten | 8 | 17 | |
| # pat. met één eerdere punctie ¹ | 3 | 9 | |
| # pat. met twee eerdere puncties ¹ | 5 | 8 | |
| gem. leeftijd man | 38,4 ± 6,2 | 37,9 ± 7,4 | p = 0,864 |
| gem. leeftijd vrouw | 33,3 ± 3,6 | 32,1 ± 4,8 | p = 0,498 |

¹ voorafgaande puncties zonder bevruchting

semenparameters bij punctie

| | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| gem. # bewegende zaadcellen/ml | 11,9 ± 9,0 | 11,2 ± 11,5 | p = 0,871 |
| gem. # zaadcellen/ml | 29,6 ± 20,3 | 23,3 ± 17,7 | p = 0,464 |
| gem. motiliteit | 48% ± 28 | 46% ± 26 | p = 0,898 |

resultaten in-vitro-inseminatie

| | | |
|---------------------|-------------------------|---------------------|
| # eicellen voor IVF | 46 | 60 |
| # embryo's na IVF | 19 (41,3%) ² | 5 (8%) ³ |

² Chi²=14,33, p<0,001

HOOFDSTUK 8

resultaten micro-inseminatie

Chi²-toets

| | | | |
|----------------------|------------|------------|----------|
| # eicellen voor m.i. | 45 | 99 | |
| # embryo's na m.i. | 15 (33,3%) | 0 | |
| # onrijpe eicellen | 6 (13,3%) | 13 (13,1%) | p = 0,97 |
| polyspermie | 3 (6,7%) | 0 | |

patiënten behorende tot een groep met bepaalde semenparameters

| | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------|
| zaadcellen totaal <20x10 ⁶ /ml | 3 pat.(38%) ³ | 8 pat.(47%) ³ | p=0,65 |
| motiliteit <40% | 3 pat.(38%) | 5 pat.(29%) | p=0,69 |
| zaadcellen totaal <10x10 ⁶ /ml | 1 pat.(13%) | 5 pat.(29%) | p=0,36 |
| bewegende zaadcellen <5x10 ⁶ /ml | 3 pat.(38%) | 8 pat.(47%) | p=0,65 |
| bewegende zaadcellen <1,5x10 ⁶ /ml | 1 pat.(13%) | 4 pat.(24%) | p=0,52 |

3 Aantal patiënten per groep t.o.v. totaal aantal patiënten

Uit tabel 8.5 blijkt dat als geen bevruchting ontstond m.b.v. micro-inseminatie, ook in-vitro-inseminatie weinig succesvol was.

In tabel 8.6 staan de resultaten van de patiënten die al één resp. twee voorafgaande IVF-pogingen gehad hebben.

TABEL 8.6: Vergelijking resultaat patiënten met één resp. twee IVF-pogingen zonder bevruchting.

| Aantal voorafgaande puncties zonder bevruchting | één (n=12) | twee (n=13) |
|--|--------------------------|--------------------------|
| resultaten in-vitro-inseminatie | | |
| # eicellen | 53 | 53 |
| # embryo's | 10 (19%) ¹ | 14 (26%) ¹ |
| 1 Chi ² =0,86,p=0,35,n.s. | | |
| resultaten micro-inseminatie | | |
| # eicellen | 78 | 66 |
| # embryo's | 5 (6%) ² | 10 (15%) ² |
| # onrijpe eicellen | 8 (10%) ³ | 11 (17%) ³ |
| # polyspermie | 0 | 3 (4,5%) |
| 2 Chi ² =2,83,p=0,09,n.s.; 3 Chi ² =1,28,p=0,26,n.s. | | |
| Semenparameters bij punctie | | |
| gem. # bewegende zaadcellen | 9,4 ± 10,5 ⁴ | 13,4 ± 10,7 ⁴ |
| gem. # zaadcellen x 10 ⁶ /ml | 18,3 ± 17,7 ⁵ | 31,7 ± 17,2 ⁵ |
| gem.% motiliteit | 49% ± 26 ⁶ | 44% ± 26 ⁶ |

Students T-test 4 p=0,363; 5 p=0,070; 6 p=0,627

Patiënten die al twee voorafgaande IVF-pogingen ondergingen hebben een iets hoger bevruchtigingspercentage behaald dan patiënten met één voorafgaande IVF-poging, zowel met micro-inseminatie als met in-vitro-inseminatie. Dit verschil is echter niet

statistisch significant. Ook hebben patiënten met twee voorafgaande pogingen gemiddeld betere semenparameters bij punctie dan patiënten met één voorafgaande IVF-poging.

8.6 DISCUSSIE

Er zijn maar weinig studies waar micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie binnen één behandeling van één patiënt vergeleken werden. Alleen Fishel (Fishel,1992) en Sakkas (Sakkas,1992) hebben deze vergelijking gemaakt (zie ook tabel 9.7). Cohen vergeleek binnen één behandeling micro-inseminatie met zona-incisie.

Een vergelijkende studie binnen één behandeling is natuurlijk alleen mogelijk als er voldoende eicellen en zaadcellen zijn. Bovendien menen vele onderzoekers dat bij één of meer IVF-pogingen zonder bevruchting een herhaling van IVF niet zinvol is (Steirteghem,1992).

Er zijn twee indicaties voor micro-inseminatie die nader onderzoek behoeven. Ten eerste patiënten met zeer slechte semenparameters (minder dan 1 miljoen bewegende zaadcellen/ml in het ejaculaat) en ten tweede patiënten die één of meerdere malen geen bevruchting hadden bij hun IVF-pogingen.

Ons onderzoek was gericht op de tweede groep patiënten. Deze patiëntengroep bleek zeer gemotiveerd te zijn voor deelname aan een nieuwe techniek. Geen van de benaderde patiënten heeft de micro-inseminatie afgewezen. De meest patiënten meldten als belangrijkste reden voor hun deelname de hoop dat een nieuwe techniek, hoe klein de kans op succes ook zal zijn, hen die extra kans geeft op bevruchting die zij bij IVF niet denken te hebben.

Zoals te zien in Tabel 8.3 zijn er significante verschillen tussen de groep patiënten met één voorgaande IVF-poging en de groep patiënten met twee voorafgaande pogingen betreffende de concentraties zaadcellen en de motiliteit.

De verschillen in de aantallen zaadcellen (totaal en bewegend) tussen beide groepen worden mogelijk verklaard doordat patiënten met redelijke aantallen zaadcellen (meer dan 20 miljoen zaadcellen/ml) eerder geadviseerd worden om nog een IVF-behandeling te ondergaan na een voorafgaande mislukking, dan patiënten met lage aantallen zaadcellen. Patiënten met één mislukte IVF-poging en slechte semenparameters werden eerder doorverwezen door de arts voor micro-inseminatie.

Uit Tabel 8.6 blijkt dat patiënten met twee mislukte IVF-pogingen nog een redelijk goede kans hadden op bevruchting met in-vitro-inseminatie (4 van de 13 patiënten, 14 van de 53 eicellen bevrucht). Een studie naar het resultaat van een nieuwe bevruchtingsmethode moet in deze groep patiënten dus altijd met een controlegroep vergeleken worden.

In de groep patiënten waarbij IVF en micro-inseminatie vergeleken konden worden, werd met micro-inseminatie geen beter resultaat behaald dan met in-vitro-inseminatie (zie Tabel 8.4). Er werden met micro-inseminatie zelfs minder eicellen bevrucht dan met in-vitro-inseminatie.

Er zijn twee verklaringen mogelijk. Als eerste: het kan zijn dat de techniek van micro-inseminatie een beschadiging in de bevruchtingscapaciteit van eicel of zaadcel veroorzaakt, hoewel dit bij de muis niet aangetoond kon worden (zie hoofdstuk 7).

Een tweede verklaring is dat bij micro-inseminatie te weinig zaadcellen geïnjec-

teerd werden die tot bevruchting in staat waren en moeten er dus meer zaadcellen geïnjecteerd worden om de bevruchtungskans te verhogen.

Het percentage polyspermie na micro-inseminatie was hoog (3 van de 144 gemicro-insemineerde eicellen (2%), 3 van de 18 bevruchte eicellen (16,7%)). Op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt ziekenhuis heeft 5% van alle eicellen na IVF drie of meer pronuclei. Bij Fishel (Fishel,1992) is het percentage polyspermie 0,4% van alle embryo's die na micro-inseminatie ontstonden, hij injecteerde 2 tot 10 zaadcellen per eicel. Sakkas (Sakkas,1992) had een polyspermiepercentage van 18,5% bij de injectie van 4 zaadcellen in de perivitelline ruimte, en zelfs een verdubbeling hiervan na injectie van 5 tot 10 zaadcellen. Cohen (Cohen,1991) beschrijft een veel kleinere serie eicellen dan Fishel en Sakkas waarbij hij micro-inseminatie toepaste. Hij vindt in zijn serie een zeer hoog percentage polyspermie, bij injectie van 3 tot 5 zaadcellen vertoonden 6 van de 9 bevruchte eicellen polyspermie, bij de injectie van meer dan 9 zaadcellen waren alle bevruchte eicellen (6 van de 11 behandelde eicellen) door meer dan één zaadcel bevrucht.

De semenparameters bij de patiënten behandeld door Sakkas en door Cohen zijn beter dan bij de patiënten die Fishel behandelde, dit zou een verklaring voor het hoge polyspermie percentage bij Cohen en Sakkas kunnen zijn.

Ook in ons onderzoek hadden de patiënten redelijk goede semenwaarden. Het lijkt dan ook veilig om meer dan 3-5 zaadcellen per eicel te injecteren bij patiënten met zeer slechte semenwaarden, maar voorzichtig te zijn bij patiënten met redelijke semenparameters.

Dat geen van de vier patiënten die embryo's uit de micro-inseminatie groep getransplanteerd kreeg zwanger werd, hoeft niet te betekenen dat deze embryo's van slechte kwaliteit zijn. Het aantal patiënten is te klein om hier een uitspraak over te kunnen doen.

Dat zwangerschappen mogelijk zijn en dat het resultaat van deze zwangerschappen en de geboren kinderen niet afwijkend zijn is door verschillende onderzoekers al bewezen (Ng,1988; Fishel,1990; Fishel,1991; Steirteghem,1992; Sakkas,1992). Het percentage zwangerschappen bij deze onderzoekers is laag, 5% van alle behandelde patiënten bij Fishel (Fishel,1992) en 2% bij Sakkas (Sakkas,1992). Zowel bij Fishel als bij Sakkas werden bij de meeste transplantaties maar één of twee embryo's getransplanteerd. De reden hiervoor was eenvoudig: er waren niet meer dan twee embryo's ontstaan bij de meeste patiënten. Zoals bekend geeft transplantatie van maar één embryo minder kans op zwangerschap dan transplantatie van drie of vier embryo's.

De resultaten van ons onderzoek zijn alleen goed te vergelijken met de resultaten van Fishel (Fishel,1992) en Sakkas (Sakkas,1992). Deze beschrijven beide een deelonderzoek binnen hun studie waarin micro-inseminatie en in-vitro-inseminatie binnen één behandeling van één patiënt vergeleken worden. In Tabel 8.7 staan de resultaten van dit deelonderzoek van deze onderzoekers vermeld.

MICRO-INSEMINATIE BIJ DE MENS

Tabel 8.7: resultaten van Fishel (Fishel,1992) en Sakkas (Sakkas,1992) in een vergelijkende studie: micro-inseminatie versus in-vitro-inseminatie.

| | Fishel (Fishel,1992) | | Sakkas (Sakkas,1992) | |
|-------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | micro-ins. | in-vitro-ins. | micro-ins. | in-vitro-ins. |
| # eicellen | 378 | 281 | 43 | 46 |
| # embryo's | 88 (23,2%) ¹ | 14 (5,0%) ¹ | 12 (27,9%) ² | 2 (4,3%) ² |
| | 1 Chi ² =39,9 p<0,01 | | 2 Chi ² =7,6 p<0,01 | |
| | Resultaten patiënten (n=91) | | | |
| # patiënten | micro-ins. | in-vitro-ins. | | |
| 10 | + | + | | |
| 38 | + | - | | |
| 0 | - | + | | |
| 43 | - | - | | |

In de studie van Fishel is er een verschil tussen de bevruchtungskans per patiënt en de bevruchtungskans per eicel. De bevruchtungskans per patiënt was bij Fishel met micro-inseminatie hoger bij patiënten met minder dan 10 miljoen bewegende zaadcellen in het ejaculaat. Patiënten met een hoger aantal bewegende zaadcellen hadden een veel lagere bevruchtungskans, zowel met micro-inseminatie als met in-vitro-inseminatie.

De bevruchtungskans per eicel was bij Fishel met micro-inseminatie licht verhoogd als het aantal bewegende zaadcellen in het ejaculaat groter is. Het is dus waarschijnlijk (alhoewel Fishel dit niet beschrijft) dat in de groep patiënten met lage aantallen bewegende zaadcellen in het ejaculaat meer patiënten minder bevruchte eicellen hebben en dat in de groep patiënten met hoge aantallen bewegende zaadcellen minder patiënten meer bevruchte eicellen hebben.

In onze studie is het aantal patiënten met bevruchting na micro-inseminatie lager (8 van de 25 behandelde patiënten, 32%) dan in de studie van Fishel (87 van de 225 patiënten, 39%) of die van Sakkas (66 van de 150 behandelde patiënten, 44 %). Ook is in ons onderzoek het percentage bevruchting na micro-inseminatie per eicel lager dan in beide bovenstaande studies (10,4% versus 23,3% bij Fishel en 27,9% bij Sakkas).

Een van de redenen hiervoor kan zijn dat het aantal patiënten met minder dan 10 miljoen bewegende zaadcellen in het ejaculaat in onze studie lager is dan bij Fishel, bij Fishel behalen deze patiënten het beste resultaat. Bij ons waren er maar 5 van de 17 (29,4%) patiënten met deze semenparameters, bij Fishel 70 van de 91 (77,0%).

In onze studie waren patiënten geselecteerd die met IVF geen bevruchting behaald hadden in hun vorige pogingen, ongeacht hun semenparameters. Dit zijn waarschijnlijk patiënten die zowel met micro-inseminatie als met in-vitro-inseminatie slechte resultaten behalen.

In onze studie deelden alle bevruchte eicellen na micro-inseminatie door tot embryo's. Bij Fishel deelde 94% van de bevruchte eicellen door en bij Sakkas 86%. Dit verschil zou verklaard kunnen worden door een verschil in kweekomstandigheden tussen verschillende laboratoria. Het is vrij zeldzaam dat bevruchte eicellen niet door-delen op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt ziekenhuis.

Voordat zaadcellen met de oölemma samensmelten hebben zij de acrosoomreactie ondergaan, zowel de zona pellucida als de cumulus cellen kunnen deze induceren (Cross,1988; Stock,1989). Bij micro-inseminatie worden deze barrières omzeild. In onze studie hebben wij geprobeerd een spontane acrosoomreactie af te wachten, pas zes uur na ejaculatie werd het monster gebruikt voor inseminatie. Ook Sakkas gebruikte dit tijdsinterval tot aan inseminatie (Sakkas,1992), Fishel induceerde de acrosoomreactie door gebruik te maken van een Strontium-verrijkt, Calcium arm-medium (Fishel,1992). Beschreven is dat na incubatie in dit medium, zaadcellen na het overzetten in een Calcium-rijk medium in grote mate de acrosoomreactie ondergaan (Mortimer,1988). Fishel zag echter geen verbetering in bevruchtungskans per patiënt en per eicel met gebruik van deze techniek t.o.v. een 6 uur durende incubatie in het standaard IVF-medium.

In onze studie kwamen 7 van de 17 patiënten, bij wie een vergelijking micro-inseminatie versus in-vitro-inseminatie mogelijk was, tot bevruchting met in-vitro-inseminatie (40% bevruchtungskans per patiënt). Micro-inseminatie zou voor deze groep patiënten een reële behandelingsmethode zijn, indien de bevruchtungskans per patiënt veel hoger zou liggen, b.v. 80%.

Een verschil van 40% bevruchtungskans na in-vitro-inseminatie en 80% na micro-inseminatie zou volgens onze onderzoeksopzet met de test van McNemar al met 19 patiënten aangetoond kunnen worden (Lachiu,1981).

Van deze 19 patiënten behoren minimaal 9 patiënten de volgende combinatie van bevruchting te hebben: micro-inseminatie:+, in-vitro-inseminatie:-. Van de 17 tot nu toe behandelde patiënten is er slechts één met deze combinatie. Met nog maar twee te behandelen paren is het daarom onmogelijk ooit een statistisch significant verschil te behalen.

Zowel in onze studie als in de andere genoemde studies ligt de belangrijkste hindernis bij het succes van de micro-inseminatie bij het behalen van bevruchting van de eicel. Verder onderzoek naar verbetering van de bevruchtungskans per eicel is daarom noodzakelijk.

8.7 REFERENTIES

Bongso TA, Sathananthan AH, Wong PC, Ratnam SS, Ng S-C, Anandakumar C, Ganatra S. Human fertilization by micro-injection of immotile spermatozoa. *Human Reprod* 1989; 4: 175-179.

Brandriff BF, Gordon LA, Haendel S et al. The chromosomal constitution of human sperm selected for motility. *Fertil Steril* 1986; 46: 686-690.

Brandriff BF, Gordon LA, Moore D et al. An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 29-36.

Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ et al. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 1989; 337: 373-376.

Cohen J, Talansky BE, Malter H, Alikani M, Adler A, Reing A et al. Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Human Reprod* 1991; 6: 118-123.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Induction of acrosome reactions by human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38: 235-244.

Depypere HT, McLaughlin KJ, Seaman RF et al. Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 205-211.

Edwards RG. Communication at the Fourth World Conference of In Vitro Fertilization, Melbourne, Australia. 1985, November 18-22.

Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Lisi F, Chiariello F et al. Twin birth after subzonal insemination. *Lancet* 1990; 335: 722-723.

Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by subzonal insemination (SUZI). *Human Reprod* 1991; 6: 124-130.

Fishel S, Timson J, Lisi F, Rinaldi L. Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1992; 57: 840-849.

Gordon JW, Talansky BE. Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* 1986; 239: 347-354.

Hogan B, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; 97-109.

Kola I, Lacham O, Jansen RPS, Turner M, Trounson A. Chromosomal analysis of human oocytes fertilized by micro-injection of spermatozoa into the perivitelline space. *Human Reprod* 1990; 6: 575-577.

Lachiu J. Introduction to sample size determination for clinical trials. *Controlled Clinical Trials* 1981; 2: 93-113.

Lavy G, Boyers SP, DeCherney AH. Hyaluronidase removal of the cumulus oophorus increases in vitro fertilization. *J of In-Vitro-Fertil and Embryo-Trans* 1988; 5: 257-260.

Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by micro-injection of a single spermatozoan under the zona pellucida. *Fertil Steril* 1987; 48: 637-642.

Mahadevan MM, Trounson AO. Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 43: 263-267.

Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989; 51: 139-148.

Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38: 1077-1083.

Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yama-moto J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Human Gen* 1987; 77: 108-114.

Mortimer D, Chorney MJ, Curtis EF, Trounson AO. Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. *J Exp Zool* 1988; 246: 194-201.

Ng S-C, Bongso A, Ratnam SS et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 1988; II: 270.

Ng S-C, Ratnam S. Transfer of human sperm into the perivitelline space of human oocytes after zona-drilling or zona-puncture. *Fertil Steril* 1989; 52: 73-83.

Nielsen J. Chromosome examination of newborn children. Purpose and ethical aspects. *Humangenetik* 1975; 26: 215-222.

O'Neill GT, Kaufman MH. Influence of postovulatory aging on chromosome segregation during the second meiotic division in mouse oocytes: a parthenogenetic analysis. *J Exp Zool* 1988; 248: 125-131.

Odawara Y, Lopata A. A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentrations: a mouse model. *Fertil Steril* 1989; 51: 699-704.

Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J et al. Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos. *Human Reprod* 1987a; 2: 29-35.

Plachot M, de Grouchy J, Junca AM et al. From oocyte to embryo: a model, deduced from in vitro fertilization for natural selection against chromosome abnormalities. *Ann Genet* 1987b; 30: 22-32.

Sakkas D, Lacham O, Gianaroli L, Trounson A. Subzonal sperm microinjection in cases of severe male factor infertility and repeated in vitro fertilization failure. *Fertil Steril* 1992; 57: 1279-1288.

Sathananthan AH, Ng S-C, Trounson A, Bongso A, Laws-King A, Ratnam SS. Human micro-insemination by injection of single or multiple sperm: ultrastructure. *Human Reprod* 1989; 4: 574-583.

Savion M, Singer R, Sagiv M, Segenreich, Servadio C. Hyaluronidase activity in split human semen. *Int J Fertil* 1986; 31: 227-228.

Schlesselman JJ. How does one assess the risk of abnormalities from human in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 135-148.

Steirteghem AC van, Palermo G. Questions arising from assisted fertilization. *TFO* 1992; 6: 38-40.

Stock CE, Bates R, Lindsay KS, Edmonds DK, Fraser LR. Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 723-730.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Eng J Med* 1988; 319: 189-194.

Yamada K, Stevenson AFG, Mettler L. Fertilization through spermatozoal microinjection:

significance of acrosome reaction. Human Reprod 1988; 3: 657-661.

Zeilmaker GH. The laboratory procedure of in-vitro fertilization; some observations and conclusions. In: J Nunez (ed). From Hormones and cell regulation. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 1986; 139: 43-54.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de behandeling van mannelijke infertiliteit door middel van in vitro fertilisatie beschreven. Al snel na de eerste toepassing van in-vitro-fertilisatie bij infertiliteit ten gevolge van tubapathologie werd IVF ook toegepast bij mannelijke infertiliteit. IVF is het samenbrengen van gameten buiten het lichaam met als doel de bevruchting. Na de bevruchting wordt het embryo nog enige dagen in-vitro gekweekt totdat het naar de uterus getransplanteerd kan worden.

Het proces van gameetvorming en de bevruchting worden beschreven in hoofdstuk 1. De rijpe eicel en zaadcel zijn ontstaan uit een aantal mitotische en twee meiotische delingen. De kop van de zaadcel wordt omgeven door het zgn. acrosoom. Bij passage van de cumulus en de zona pellucida van de eicel zal de zaadcel enzymen uit het acrosoom verliezen, de acrosoomreactie. Door de enzymatische werking van de acrosomale eiwitten en door de mechanische kracht van de zaadcelstaart dringt de zaadcel door de zona pellucida. Na contact van de zaadcel met de eicelmembraan fuseren beide celmembranen en voltooit de eicel de tweede meiotische deling. Hierna kan het embryo ontstaan.

De weg van de ontdekking van het bestaan en de functie van zaadcel en eicel tot de ontwikkeling van de in-vitro-fertilisatie is lang geweest. Pas vanaf 1970 was het mogelijk menselijke embryo's in-vitro te kweken. Deze geschiedenis staat beschreven in hoofdstuk 2.

Omdat IVF nu bij zoveel patiënten wordt toegepast is het mogelijk om de behandeling van verschillende groepen patiënten te vergelijken. Deze studie is in hoofdstuk 3 verricht voor de huidige behandeling van mannelijke infertiliteit op het IVF-laboratorium van het Dijkzigt-ziekenhuis. De patiënten werden in groepen verdeeld naar gelang de concentratie bewegende zaadcellen in het ejaculaat. Er werden zeven groepen geformeerd met logaritmisch oplopende zaadcelconcentraties. Vervolgens werd gekeken naar het resultaat per punctie en per patiënt. Puncties met lage zaadcelconcentraties bleken een lager bevruchtingspercentage te hebben (aantal patiënten met bevruchting/ totaal aantal patiënten in de zaadcelgroep) dan puncties met een hogere zaadcelconcentratie. Bij puncties met een concentratie bewegende zaadcellen van $1 \times 10^6/\text{ml}$ trad in 34% van de gevallen bevruchting op, bij de groep van $4-8 \times 10^6/\text{ml}$ was dit al 69% en in de hoogste groepen was dit 90%.

Als er bevruchting was opgetreden, bleek het zwangerschapspercentage bij alle groepen gelijk te zijn. Ook als gekeken werd naar andere kwaliteitscriteria voor embryo's, zoals het aantal morfologische goede embryo's dat getransplanteerd werd of naar de mogelijkheid van cryopreservatie, werd geen verschil in kwaliteit van de embryo's tussen de zaadcelgroepen gevonden.

Patiënten werden in bovenstaande zaadcelgroepen ingedeeld al naar gelang de gemiddelde zaadcelconcentratie tijdens de puncties. Patiënten met lage concentraties bewegende zaadcellen hebben een lager totaal zwangerschapspercentage, maar ondernemen ook minder pogingen dan patiënten met hoge concentraties. Het zwangerschapspercentage loopt op van 0% in de laagste zaadcelgroep tot 44% in de hoogste zaadcelgroep.

Om het bevruchtigingspercentage bij patiënten met lage zaadcelconcentraties te

verbeteren werd de zogenaamde Percoll-methode toegepast bij de isolatie van de zaadcellen. Percoll is een visceuze oplossing die in staat is zaadcellen na centrifugeren op basis van beweeglijkheid te scheiden. In hoofdstuk 4 wordt het effect van Percoll-scheiding bestudeerd.

Bij een IVF-behandeling van een patiënt werden eicellen en zaadcellen verdeeld. Een deel van de zaadcellen werd op de routinewijze, d.m.v. centrifugeren en opzwellen bewerkt. Het ander deel onderging een Percoll-bewerking. Bevruchting trad met de Percoll-bewerking statistisch significant vaker op dan na de centrifugering/opzwellmethode. Dit geldt zowel voor het aantal patiënten met bevruchting als voor het aantal embryo's dat ontstond. Ook werden embryo's die ontstonden uit de zogenaamde Percoll-zaadcellen vaker getransplanteerd dan de embryo's die op de routinematige wijze ontstaan waren.

Er blijven veel patiënten over die met IVF geen bevruchting behalen of die zulke lage aantallen zaadcellen bezitten, dat zij voor IVF niet in aanmerking komen. Voor deze patiënten werd de micromanipulatie ontwikkeld. In hoofdstuk 5 worden de verschillende methoden van micromanipulatie beschreven en in de hoofdstuk 6 wordt de ontwikkeling van de door ons gebruikte methode van micro-manipulatie, de zogenaamde micro-inseminatie beschreven. Bij micro-inseminatie wordt een zaadcel met een glazen pipet onder de zona pellucida van de eicel gebracht.

In hoofdstuk 7 wordt het dierexperimenteel deel van onze studie naar het resultaat van micro-inseminatie behandeld. Micro-inseminatie van twee tot vijf zaadcellen bij één eicel bleek een hoger bevruchtingspercentage te geven dan micro-inseminatie van slechts één zaadcel. Het percentage polyspermie bleek na injectie van meerdere zaadcellen niet verhoogd te zijn. Verder bleek dat embryo's die na micro-inseminatie ontstaan waren in dezelfde mate uitgroeiden tot blastocysten en daarna hatching ondergingen als embryo's ontstaan na een in-vitro-inseminatie. Na transplantatie naar de uterus van een acceptor van de micro-inseminatie embryo's werd een zelfde percentage nakomelingen geboren als na transplantatie van in-vitro-inseminatie embryo's.

Na de succesvolle afronding van de micro-inseminatie experimenten bij de muis werd een aanvraag tot toepassing van micro-inseminatie bij de mens bij de Medisch Ethische Commissie van het Dijkzigt Ziekenhuis ingediend. Deze aanvraag staat vermeld in het laatste hoofdstuk van het proefschrift, hoofdstuk 8. Na toestemming van de aanvraag werden 25 patiëntenparen behandeld. Een groep eicellen onderging micro-inseminatie en een groep een in-vitro-inseminatie. Na afloop werden de bevruchtingspercentages van beide groepen vergeleken. Micro-inseminatie bleek geen hoger bevruchtingsresultaat te geven dan de in-vitro-inseminatie. Dit tegenvallend resultaat zou mogelijk te wijten zijn aan een verkeerde indicatiestelling. Voor deze studie werken namelijk patiënten geselecteerd die al één of meer IVF-pogingen zonder bevruchting gehad hadden. Er werd niet naar de zaadcelconcentratie gekeken. Een vervolgonderzoek naar het resultaat van micro-inseminatie bij patiënten met zeer lage aantallen zaadcellen kan meer licht brengen over het effect van deze methode.

SUMMARY

This thesis describes the treatment of male infertility by in-vitro-fertilization. IVF was a treatment for infertility caused by tubal blockage. Thereafter IVF was also used as a treatment for male infertility. IVF is the bringing together of the gametes outside the female body. After fertilization the embryo is cultured in an incubator before it will be transplanted to the uterus.

The process of development of the gametes and fertilization is described in chapter 1 of this thesis. A mature sperm and oocyte are formed after mitotic and meiotic divisions. The head of the spermatozoa is covered by the acrosome. During passage of the cumulus and the zona pellucida of the oocyte, the acrosome loses its enzymes, the acrosomal reaction. By means of the enzymatic action of the acrosomal proteins and the mechanical force of the beating sperm tail, the sperm penetrates the zona pellucida. After contact of the sperm with the cell membrane of the oocyte, the membranes fuse and the oocyte completes its second meiotic division. After this process the embryo is formed.

The history of the discovery of the gametes and fertilization and the first successful attempt to achieve a fertilization in-vitro are described in chapter 2. It was only from the beginning of the seventies that it was possible to culture human embryos in-vitro.

Since so many patients today are treated by IVF it is possible to compare the results of different groups of patients. In chapter 3 the results of IVF for male infertility on the IVF-laboratory of the Dijkzigt Hospital are described. Patients were grouped according to the concentration of motile sperm in the ejaculate. Seven groups were formed, on a logarithmic ascending scale. Results were studied per ovum pick-up and per patient. Ovum pick-ups with a low sperm concentration did have a lower fertilization rate (total number of punctures with fertilization/total number of punctures in that group) than punctures with a high sperm concentration. Punctures with a concentration of motile sperm of $1 \times 10^6/\text{ml}$ had a fertilization rate of 34%, in the group with $4.8 \times 10^6/\text{ml}$ the fertilization rate was 69% and in the groups with the highest concentrations the fertilization rate was 90% per ovum pick-up. After fertilization had been achieved the percentage of pregnancy was the same for all groups. Other criteria to determine quality of embryo's, such as the number of morphologically good embryo's being transplanted or the possibility of cryopreservation showed no difference between the sperm groups.

Patients were divided into the same groups as for the punctures on the concentration of motile sperm. The mean sperm concentration of all punctures from a patient was taken. Patients with a low sperm concentration did have a lower pregnancy rate than patients with higher concentrations. However patients with low sperm concentrations underwent fewer treatments than the other patients. The pregnancy rate differed from 0% in the lowest sperm groups to 44% in the higher sperm groups.

In an attempt to improve the fertilization rate of patients with low sperm concentrations the so called Percoll-method was used. Percoll is a solution of high viscosity which can divide sperm on basis of their motility. In chapter 4 the effect of Percoll-

SUMMARY

division is studied. The oocytes and sperm of a patient were divided into two groups. One part of the ejaculate was treated in the routine way by centrifugation and swim-up. The other part of the ejaculate underwent a Percoll-treatment. After Percoll-treatment more patients and more oocytes had shown signs of fertilization than after the centrifugation/swim-up method. Embryo's derived from the Percoll-treatment were more frequently transplanted than embryo's from the centrifugation/swim-up treatment.

Many patients do not achieve fertilization with IVF or they have such low numbers of sperm in their ejaculate, that IVF is discouraged for them. For these patients micromanipulation has come into use. In **chapter 5** different methods of micromanipulation are described and in **chapter 6** the development of the so called micro-insemination, the method we choose for micromanipulation, is described in more detail. Micro-insemination is carried out by manipulating a spermatozoa under the zona pellucida of an oocyte with a small glass pipet.

In **chapter 7** the results of micro-insemination in a mouse-model are described. Micro-insemination of two till five sperm cells under a zona gave a higher fertilization rate than micro-insemination of only one spermatozoa. The percentage of polyspermia was not higher after injection of more sperm. Embryo's resulting from micro-insemination developed into blastocysts and underwent hatching. After transplantation to the uterus of an acceptor embryo's resulting from micro-insemination developed into offspring.

After the successful completion of the experiments with micro-insemination in the mouse permission was requested from the Medical Ethical Commission of the Dijkzigt Hospital to perform micro-insemination in patients. This request is described in the last chapter of the thesis, **chapter 8**. Following permission 25 patients were treated. One group of oocytes underwent micro-insemination and the other group conventional in-vitro-insemination. After treatment the results of both groups were compared. Micro-insemination gave no better fertilization rate than in-vitro-insemination. This disappointing result could be ascribed to the fact for this study patients were selected who already had undergone one or more IVF-attempts without the occurrence of fertilization. The sperm concentration played no role. Possibly experiments with micro-insemination in a group of patients with very low sperm concentrations would provide better insight about the usefulness of this technique.

Lijst van gebruikte afkortingen

| | | |
|-------|---|--|
| ADP | = | Adenosinedifosfaat |
| ATP | = | Adenosinetrifosfaat |
| AZR | = | Academisch Ziekenhuis Rotterdam |
| BSA | = | Bovine Serum Albumine (Runder Serum Albumine) |
| C/O | = | Centrifugatie/Opzwemmethode |
| c-AMP | = | cyclisch Adenosinemonofosfaat |
| DNA | = | Desoxyribonucleïnezuur |
| FSH | = | Follikel Stimulerend Hormoon |
| GPO | = | Gepasteuriseerde Plasma-eiwitOplossing |
| HCG | = | Humaan Chorion Gonadotrofine |
| HMG | = | Humaan Menopauzaal Gonadotrofine |
| IRIS | = | Interactief Registratie en Identificatie Systeem |
| IVF | = | In-Vitro-Fertilisatie |
| KEMO | = | Kerncommissie Ethiek Medisch wetenschappelijk Onderzoek van de gezondheidsraad |
| LH | = | Luteïniserend Hormoon |
| MEC | = | Medisch Ethische Commissie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam en de Erasmus Universiteit Rotterdam |
| m.i. | = | micro-inseminatie |
| MIF | = | Müllerian Inhibitory Factor |
| n.s. | = | niet significant |
| PVP | = | PolyVinylPyrrolidon |
| s.d. | = | standaarddeviatie |
| WHO | = | World Health Organisation (Wereldgezondheidsorganisatie) |

DANKWOORD

Zonder de steun van vele anderen zou het werk voor dit proefschrift nooit uitgevoerd zijn en de resultaten nooit beschreven.

Als eerste wil ik mijn promotor Gerard Zeilmaker bedanken. Hij heeft mij de beginselen van het opzetten en uitvoeren van onderzoek bijgebracht. Zijn werkmethode: een groot deel van de experimenten zelfstandig uitvoeren en daarna de resultaten kritisch bestuderen, bleek voor mij het meest waardevol te zijn. Van Gerard heb ik ook geleerd onderzoeksresultaten van anderen kritisch te bezien. Met bewondering heb ik van zijn doorzettingsvermogen bij de introductie en de uitvoering van het onderzoek, zelfs bij tegenwerking, geleerd. Zijn fijne neus voor relevante nieuwe ontdekkingen zal ik wel nooit krijgen.

Ik wil de leden van de promotiecommissie de professoren Drogendijk, Lamberts en Van Steirteghem bedanken voor de beoordeling van dit proefschrift. Professor Drogendijk heeft ook diverse malen geholpen bij het opstellen van de protocollen voor de Medisch Ethische Commissie.

De allereerste beginselen van het IVF-laboratorium zijn mij bijgebracht door Nadia Lo-A-Njoe en Renée van de Graaf. In de loop van de jaren is dit kleine clubje uitgegroeid tot een grote groep collega's en vrienden in Rotterdam en Voorburg. Met Ellen Rijnders en Gerda Huisman heb ik diverse malen gestoeid over onze wetenschappelijke resultaten, niet alleen in Rotterdam maar ook op diverse congressen. Van al de analisten wil ik in het bijzonder Jacqueline Termeulen danken voor haar bijdrage aan veel experimenten. De Percoll-studie is voor een groot deel voorbereid door Grada van den Dool tijdens haar keuzecollegium.

De benadering van patiënten zou onmogelijk geweest zijn zonder de steun van de gynaecologen Bert Alberda, Arie Verhoeff en Bob Leerentveld.

De allereerste beginselen van de micromanipulatie zijn mij bijgebracht door Arnold Hekman, ook later heb ik hem lastig gevallen met vele vragen en verzoeken.

Mijn dank gaat ook uit naar de medewerkers van de voormalige afdeling Fysiologie II, waar het merendeel van dit onderzoek werd uitgevoerd.

Veel ben ik verschuldigd aan Rina Berkhout en Willem van Donkelaar, die de opmaak van het proefschrift verzorgd hebben.

De belangrijke basis voor dit proefschrift werd natuurlijk geleverd door mijn ouders. Hun enthousiasme en geduld tijdens al die jaren is voor mij altijd de belangrijkste stimulans geweest om de zaken te voltooien waar ik eenmaal aan begonnen was. Het is erg jammer dat mijn moeder het resultaat van dit werk niet meer heeft mogen zien. Ik probeer dit leed te verzachten door dit proefschrift aan haar op te dragen.

Bijna vanaf het begin van het onderzoek heb ik Paula thuis lastig gevallen met alle problemen bij de experimenten en het werk. Vaak heeft ze, zonder het te beseffen, die problemen voor mij opgelost. Paula, de komende jaren hoop ik samen samen met jou en met Lisa en Eva van ons geluk te genieten.

CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 13 september 1959 te Made en Drimmelen. In 1977 behaalde hij het Atheneum B diploma aan het Onze Lieve Vrouwe Lyceum te Breda. Na het eerste jaar Civiele Techniek aan de Technische Universiteit te Delft gevolgd te hebben begon hij in 1978 aan de studie geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. In 1985 werd het doctoraalexamen behaald en in 1986 het artsexamen. Van 1987 tot 1990 was hij werkzaam als assistent in opleiding op de toenmalige afdeling Endocrinologie, Groei en Voortplanting van de Erasmus Universiteit Rotterdam. Daar werd het hier beschreven onderzoek verricht. Van januari 1991 tot maart 1993 was hij werkzaam op de afdeling Gynaecologie en Verloskunde van het Dijkzigt Ziekenhuis (hoofd Prof. dr. A.C. Drogendijk) en bij het IVF-team van het Dijkzigt Ziekenhuis (hoofd Dr. R.A. Leerentveld). Vanaf 1 maart 1993 is hij in opleiding tot klinisch chemicus in het Sophia Ziekenhuis te Zwolle (opleider dr. E.W. Kuijpers).